

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI MILANO



**Facoltà di Farmacia**

**Dipartimento di Scienze Farmacologiche e Biomolecolari**

**UN APPROCCIO TRASCRIZIONALE,  
MOLECOLARE E FUNZIONALE PER  
DEFINIRE L'ONTOGENIA DEI NEURONI  
STRIATALI UMANI**

Settore Scientifico Disciplinare: BIO14

Tutor: Prof.ssa Elena Cattaneo

Coordinatore: Prof. Alberto Panerai

**Valentina Castiglioni**

Matr. R09320

Anno accademico 2012-2013

## **INDICE**

## Scopo della tesi

### Introduzione

1. Fecondazione, segmentazione e gastrulazione nei mammiferi.
2. La formazione del tubo neurale.
3. Regionalizzazione rostro-caudale del tubo neurale.
4. Regionalizzazione dorso-ventrale del tubo neurale.
5. Organizzazione del telencefalo: pallio e subpallio.
6. Profilo di espressione dei fattori di trascrizione che definiscono il telencefalo e lo striato
7. Analisi bionformatica di *class comparison* e di *de novo class discovery*.
8. *Weighted gene co-expression network analysis* (WGCNA).

### Risultati

#### **1. Identificazione del corredo trascrizionale che determina l'identità dello striato umano durante la seconda metà del primo trimestre**

- 1.1 L'analisi di *class comparison* identifica i geni differenzialmente espressi che distinguono lo striato dalla corteccia.
- 1.2 I geni bimodali identificati definiscono il corredo trascrizionale minimo che distingue striato e corteccia durante lo sviluppo fetale umano.
- 1.3 L'analisi WGCNA identifica moduli di geni co-espressi durante lo sviluppo fetale del telencefalo umano.

#### **2. Caratterizzazione spazio-temporale di marcatori telencefalici e striatali durante lo sviluppo embrionale e fetale umano**

- 2.1 Collezione dei campioni di cervello umano fetale a diverse età gestazionali.
- 2.2 L'identità spaziale durante la fase di neurulazione e lo sviluppo embrionale precoce è definita da specifici fattori di trascrizione.
- 2.3 Fattori di trascrizione regione-specifici determinano il confine molecolare tra pallio e subpallio.
- 2.4 La combinazione di fattori di trascrizione discrimina i diversi compartimenti striatali e permette di seguire *in vivo* il differenziamento e la maturazione dello striato durante lo sviluppo fetale umano.
- 2.5 Durante il secondo trimestre lo sviluppo dello striato è accompagnato da variazioni nella combinazione dei fattori di trascrizione espressi.
- 2.6 Fattori di trascrizione striato-arricchiti sono espressi, ma non co-espressi, nella corteccia in sviluppo.

### **3. Caratterizzazione trascrizionale, molecolare ed elettrofisiologica di neuroni primari umani**

**3.1** Il profilo trascrizionale e molecolare regione-specifico dei neuroni primari è mantenuto *in vitro*.

**3.2** Il differenziamento *in vitro* dei neuroni primari determina un cambiamento trascrizionale rispetto al tessuto fetale di partenza associato a un'aumentata maturazione e funzionalità.

**3.3** Neuroni primari striatali e corticali possiedono caratteristiche elettrofisiologiche di neuroni maturi.

### **Discussione**

**1.** L'analisi di espressione genica globale definisce lo striato e la corteccia umani durante lo sviluppo embrionale e fetale.

**2.** Definizione della mappa molecolare che descrive lo sviluppo embrionale e fetale del telencefalo nell'uomo.

**3.** Definizione trascrizionale e molecolare di neuroni primari striatali e corticali.

### **Materiali e Metodi**

### **Bibliografia**

### **Pubblicazioni**



## **SCOPO DELLA TESI**

Questo lavoro di tesi ha avuto lo scopo di determinare il profilo trascrizionale e molecolare che definiscono lo striato durante lo sviluppo embrionale e fetale umano in una finestra di sviluppo compresa tra le 2 e le 20 settimane gestazionali, mai investigata in precedenza. Questo lavoro costituisce la prima descrizione del profilo di espressione spazio-temporale che determina il differenziamento dei progenitori striatali a neuroni striatali spinosi medi, e definisce, da un punto di vista molecolare, i diversi domini dello striato. I dati trascrizionali e molecolari costituiscono, inoltre, lo standard di riferimento per il differenziamento *in vitro* di cellule staminali pluripotenti a neuroni striatali e per la validazione degli anticorpi utilizzati per la caratterizzazione *in vitro* dei protocolli di differenziamento.

Diverse tecniche bioinformatiche sono state impiegate per determinare il profilo di espressione genica che distingue lo striato dalla corteccia ed, in particolare, il set minimo di geni che definisce lo striato, compresi numerosi fattori di trascrizione. Inoltre attraverso un'analisi dei networks di espressione genica sono stati identificati moduli di geni co-espressi tessuto- e tempo-specifici. Nuovi determinanti striatali, mai descritti in precedenza, sono stati identificati, inoltre sono state messe in evidenza differenze con lo sviluppo striatale descritto in letteratura nei roditori. L'analisi bioinformatica è stata accompagnata da un'ampia analisi d'immunoistochimica che comprende 35 differenti determinanti striatali, compresi fattori di trascrizione e proteine citosoliche, allo scopo di determinare il profilo di co-espressione che definisce i progenitori ventrali e i precursori e neuroni striatali durante lo sviluppo, permettendo così di determinare i diversi compartimenti striatali in cui sono localizzati. Infine la disponibilità di tessuto fresco ha reso possibile determinare il profilo trascrizionale, molecolare e funzionale di neuroni striatali e corticali primari.

# INTRODUZIONE

In questo lavoro di tesi è stato studiato lo sviluppo embrionale e fetale umano a partire dalla seconda settimana di gestazione, momento in cui le pliche neurali, generate a partire dal neuroectoderma, si muovono verso la linea mediale dell'embrione per fondersi e dare origine al tubo neurale. Il disegno sperimentale alla base di questo lavoro ha richiesto uno studio dettagliato dei meccanismi alla base del neurosviluppo, dell'organizzazione del telencefalo e dei fattori di trascrizione la cui espressione definisce le diverse aree telencefaliche prima, e i domini striatali poi.

## 1. Fecondazione, segmentazione e gastrulazione nei mammiferi

La fecondazione è il processo tramite il quale i gameti femminili e maschili si uniscono per formare un individuo che possiede un nuovo genoma derivante da quello di entrambe i genitori. La fecondazione realizza due scopi distinti: la sessualità, ossia la combinazione dei geni derivanti dai genitori, e la riproduzione cioè la formazione di un nuovo organismo.

Il concepimento è costituito da quattro fasi successive:

1. Contatto e riconoscimento tra spermatozoo e uovo;
2. Regolazione della penetrazione dello spermatozoo nell'uovo;
3. Unione del materiale genetico dello spermatozoo e dell'uovo;
4. Attivazione del metabolismo dell'uovo per dare inizio allo sviluppo.

La fecondazione è il passo iniziale verso lo sviluppo, grazie al quale lo zigote, con il suo corredo genetico, inizia la formazione di un nuovo organismo.

Dopo la fecondazione, lo sviluppo progredisce attraverso il processo della segmentazione durante il quale una serie di mitosi divide il contenuto del citoplasma dell'uovo in cellule nucleate più piccole. Durante la segmentazione le cellule sono denominate blastomeri.

Le uova dei mammiferi, essendo caratterizzate da un vitello molto scarso uniformemente distribuito, sono definite isolecitiche e la segmentazione è detta oloblastica perché il solco di segmentazione interessa l'intero uovo.

Durante lo sviluppo le uova di mammifero sono dotate di poco vitello e gli embrioni ottengono il loro nutrimento dalla madre attraverso la placenta. Nei mammiferi la segmentazione avviene con una velocità molto ridotta, circa una divisione ogni 12-24 ore, e in maniera asincrona.

Allo stadio di morula l'embrione è costituito da sedici blastomeri raggruppati tra loro che formano la massa cellulare interna (ICM), i quali sono circondati da un numero maggiore di cellule esterne dalle quali avrà origine il trofoblasto e quindi i tessuti extra-embryonali. Allo stato di sessantaquattro blastomeri la massa cellulare interna e il trofoblasto sono diventati due strati cellulari tra loro separati, esprimendo fattori di trascrizione differenti. Questa separazione rappresenta il primo evento di differenziamento nello sviluppo dei mammiferi.

Durante la fase di cavitazione le cellule del trofoblasto secernono fluidi all'interno della morula inducendo la formazione di una cavità detta blastocoele; la blastula che ne deriva è detta blastocisti.

In seguito alla segmentazione ha luogo la gastrulazione durante la quale le cellule che costituiscono la massa cellulare interna vanno incontro a una serie di movimenti che danno origine ai tre foglietti germinativi: endoderma, mesoderma ed ectoderma.

La prima segregazione di cellule nella massa cellulare interna dà luogo a uno strato inferiore, l'ipoblasto, e uno superiore, l'epiblasto.

La gastrulazione ha inizio nell'estremo posteriore dell'embrione, ed è qui che si forma la linea primitiva e, alla sua estremità anteriore, il nodo primitivo (o nodo di Hansen) attraverso il quale le cellule dell'epiblasto passano nel blastocele.

La linea primitiva definisce gli assi embrionali: si estende dall'estremità posteriore a quella anteriore; le cellule che la attraversano penetrano dal lato dorsale e si spostano su quello ventrale, infine divide la parte sinistra dell'embrione da quella destra.

Gli elementi che si trovano vicino alla linea primitiva diventeranno le strutture mediali, mentre quelli che si trovano alle estremità diventeranno le strutture distali.

Non appena si è formata la linea primitiva, le cellule cominciano ad attraversarla per giungere nel blastocele. Questo continuo spostamento fa sì che la popolazione che costituisce la linea primitiva cambi continuamente (Figura 1).

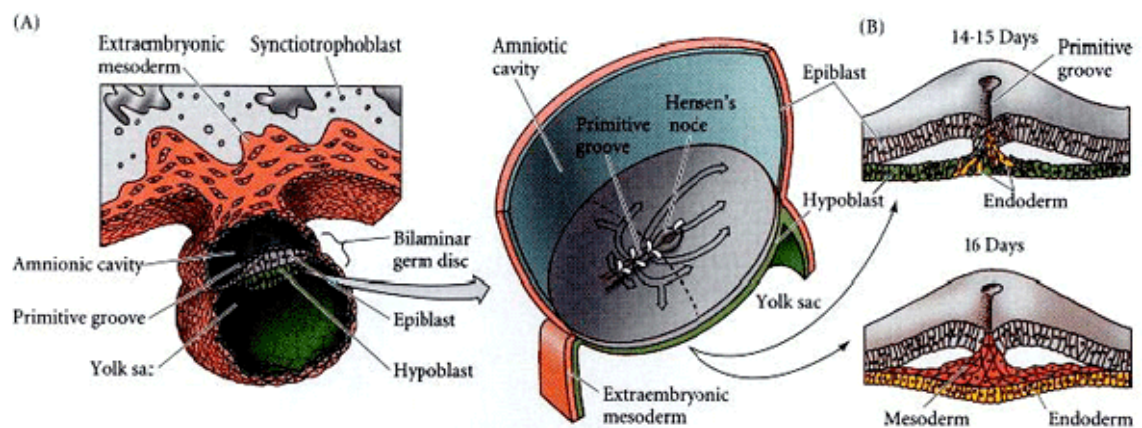


Figura 1. Schema delle prime fasi della gastrulazione nei mammiferi (tratto da *"Development of the Nervous System"*, 2005).

Le prime cellule a giungere nel blastocele andranno a costituire l'endoderma. In seguito le cellule del futuro mesoderma andranno a localizzarsi tra l'endoderma e l'epiblasto (Figura 2).

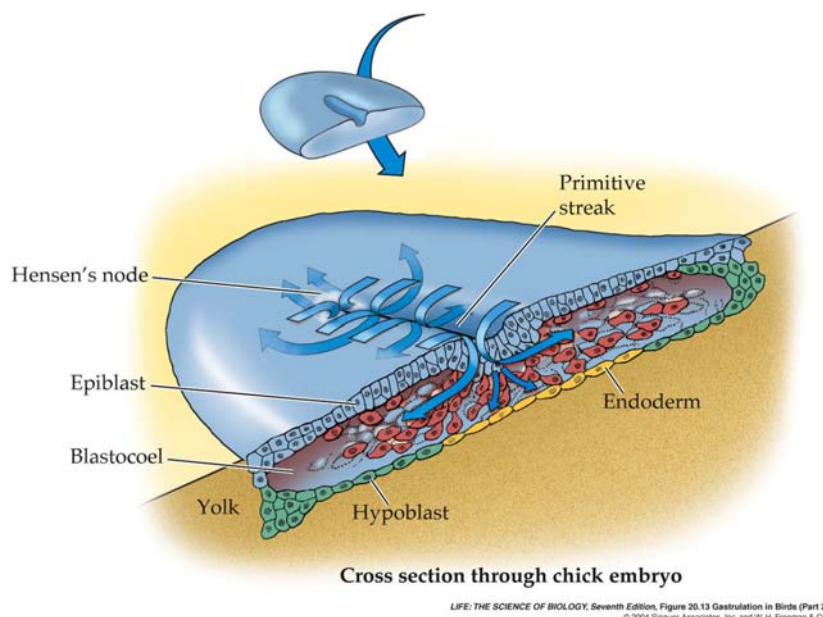


Figura 2. Schema della migrazione delle cellule dell'endoderma e del mesoderma attraverso la linea primitiva in embrioni di pollo. Nei mammiferi la migrazione avviene in maniera del tutto analoga.

La formazione dell'ectoderma ha luogo in seguito ad un'estesa proliferazione e alla successiva migrazione dei precursori dell'ectoderma localizzati anteriormente alla linea primitiva che, mediante epibolia, circondano il vitello. Dall'ectoderma hanno origine l'epidermide e il sistema nervoso centrale e periferico (Figura 3). In particolare, in seguito a eventi d'induzione, l'ectoderma dà origine al neuroectoderma da cui, a sua volta, si genererà il tessuto neurale che darà origine al sistema nervoso.

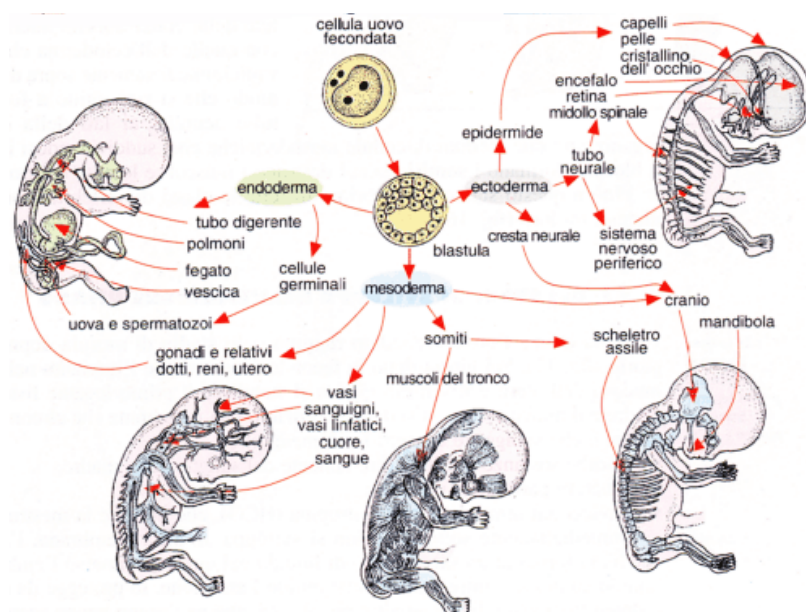


Figura 3. Schema rappresentativo dei derivati dei tre foglietti embrionali.

Esperimenti negli anfibî hanno dimostrato che l'induzione del neuroectoderma è conseguente all'inibizione di specifiche vie del segnale che inibiscono il differenziamento neurale favorendo quello a epidermide.

Il labbro dorsale del blastoporo, definito anche organizzatore, e il mesoderma dorsale producono tre diversi induttori neurali: Noggin, Follistatina e Cordina che inibiscono l'azione dell'Activina e di BMP (*Bone Morphogenetic Protein*), entrambi membri della famiglia dei TGF $\beta$ , bloccandone l'azione anti-neurale (Piccolo et al., 1996; Godsave and Slack, 1989; Grunz and Tacke, 1989) (Figura 4).

L'ectoderma possiede, quindi, la capacità innata di differenziare verso tessuto nervoso che è inibita dall'azione dell'Activina e di BMP secreti dell'ectoderma stesso.

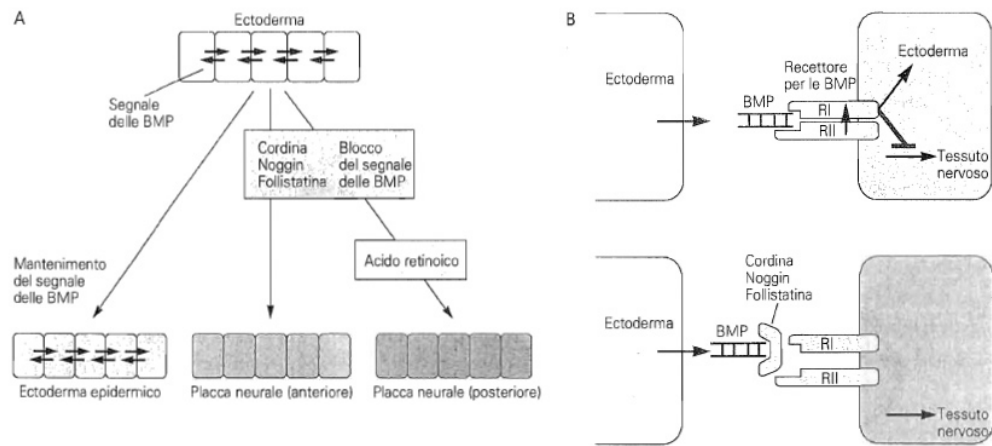


Figura 4. Vie di induzione del segnale in *Xenopus laevis* (modificata da Tanabe e Jessell, 1996).

Esperimenti negli embrioni di pollo hanno dimostrato l'esistenza di almeno un altro fattore d'induzione neurale appartenente alla famiglia dei fattori di crescita dei fibroblasti (FGF) che, inibendo la fosforilazione delle proteine Smad, blocca la via del segnale del BMP (Figura 5) agendo in maniera analoga a Noggin (Pera et al., 2003).

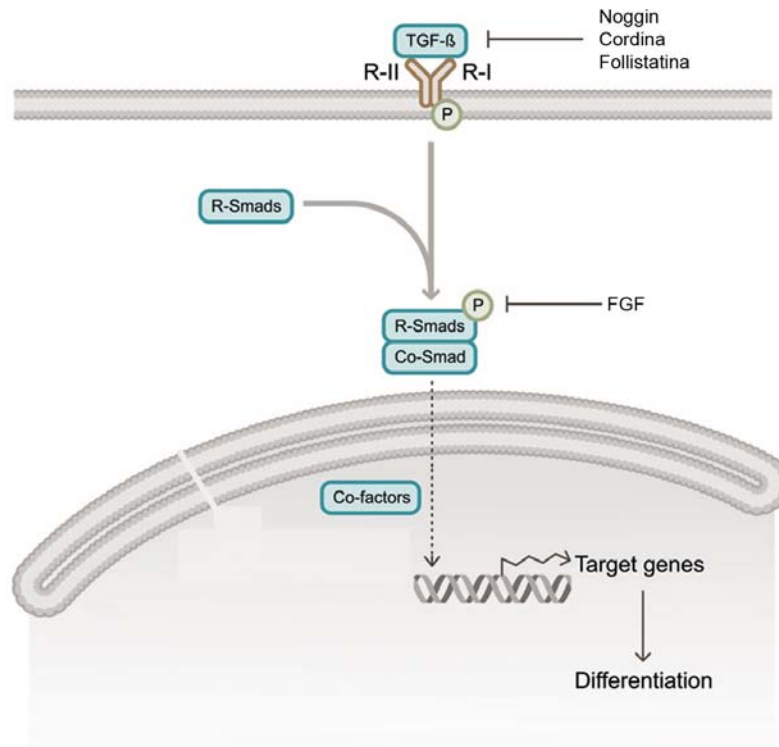


Figura 5. Via del segnale di BMP e meccanismo d'inibizione di Noggin, Cordina, Follistatina e FGF.



## 2. La formazione del tubo neurale

La neurulazione è il processo di organogenesi attraverso il quale avviene la formazione del tubo neurale a partire dal neuroectoderma.

Durante la neurulazione primaria il mesoderma dorsale, tramite la secrezione di Noggin, Follistatina e Cordina, induce la formazione della placca neurale nella porzione dorsale dell'ectoderma determinando un cambiamento nella forma delle cellule che diventano allungate. In seguito i bordi della placca neurale s'ispessiscono e si muovono verso l'alto per formare le pieghe neurali, mentre appare un solco a forma di U al centro della placca detto solco neurale. In seguito le pieghe neurali migrano verso la linea mediana dell'embrione, sospinte dall'epidermide circostante, fino a fondersi e formare il tubo neurale (Figura 6).

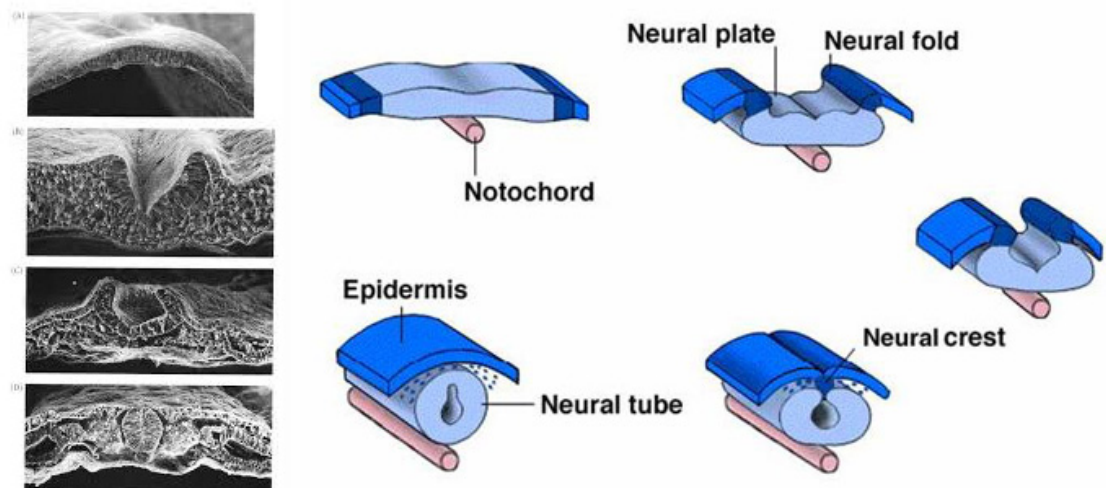


Figura 6. Rappresentazione schematica dello sviluppo del tubo neurale e della formazione delle cellule della cresta neurale (tratto da Gammill LS, 2003). Si possono distinguere le cellule della placca neurale come cellule di forma allungata nella parte dorsale dell'ectoderma. La formazione delle pieghe inizia quando le cellule del punto cardine mediale si ancorano alla notocorda e le cellule dell'epidermide presuntiva si spostano verso la linea mediana dorsale. Le pieghe neurali si sollevano mentre l'epidermide presuntiva continua a spostarsi verso la linea mediana. Si ha la convergenza delle pieghe neurali quando le cellule del punto cardine dorso-laterale assumono la forma di cuneo e le cellule dell'epidermide si spostano verso il centro. Le pieghe neurali si fondono tra loro originando il tubo neurale. In seguito alla sua formazione le cellule della cresta neurale si disperdono lasciando il tubo neurale separato dall'epidermide sovrastante.

Nell'uomo le pliche neurali si formano all'incirca al 21<sup>esimo</sup> giorno di gestazione ai lati della placca neurale (Stiles and Jernigan, 2010). La fusione delle pliche neurali inizia al centro del tubo neurale in formazione e si estende sia in direzione rostrale sia caudale per concludersi al termine della quarta settimana (Figura 7).

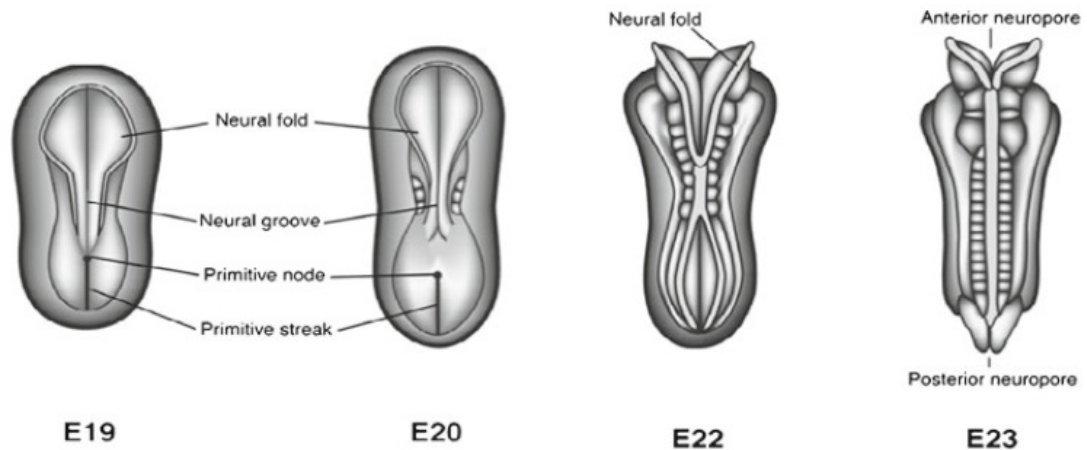


Figura 7. Nell'uomo la formazione del tubo neurale avviene tra E19 e E29. Le creste neurali si osservano a E19. Le pliche neurali si ripiegano e il processo di formazione del tubo neurale ha inizio (E20). La chiusura del tubo neurale ha luogo a partire dal giorno E22 nella sua porzione centrale. Il neuroporo anteriore si chiude a E25, quello posteriore a E27 (tratto da Stiles and Jernigan, 2010).

Alterazioni nella chiusura del tubo neurale sono responsabili di diversi difetti del tubo neurale. La mancata chiusura delle regioni posteriori del tubo neurale al giorno E27 determina una situazione patologica nota come spina bifida, al contrario la mancata chiusura delle regioni anteriori causa anencefalia (Figura 8).

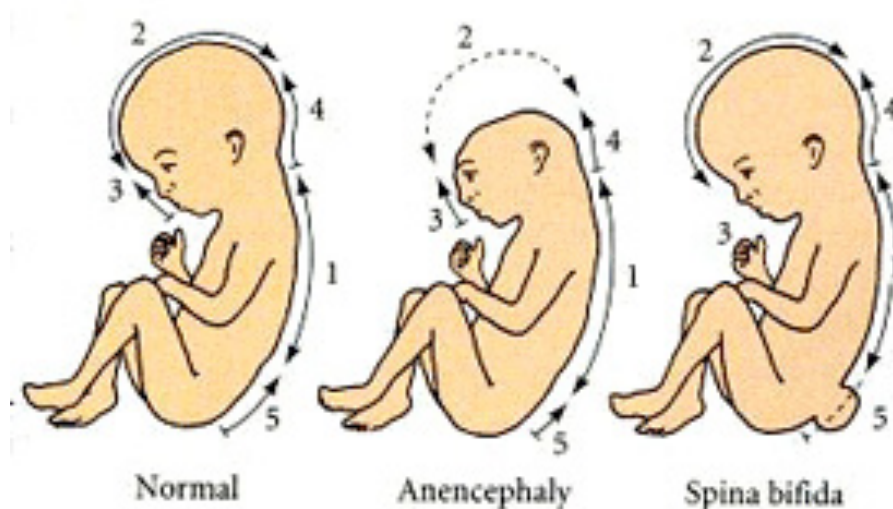


Figura 8. Alterazioni nella chiusura del tubo neurale sono causa di diverse condizioni patologiche.

Quando il tubo neurale è completo, i progenitori neuroepiteliali formano uno strato di cellule, definito zona ventricolare (VZ), che circonda la cavità del tubo neurale che più tardi nello sviluppo prenderà il nome di ventricolo.

Al termine della neurulazione l'embrione umano è lungo 3- 5mm, per poi raggiungere i 27- 31mm al termine del periodo embrionale (8<sup>a</sup> settimana).

Durante questo periodo il tubo neurale va incontro a uno straordinario cambiamento. Già prima della completa chiusura del tubo neurale, la sua porzione più anteriore si espande andando a formare le tre vescicole primarie: romboencefalo, mesencefalo e prosencefalo (Figura 5). Al termine della 7<sup>a</sup> settimana, le tre si suddividono ulteriormente. In particolare dal prosencefalo si originano il telencefalo e il diencefalo, mentre dal romboencefalo hanno origine il ponte, il cervelletto e il midollo allungato (Stiles and Jernigan, 2010) (Figura 9). Le cinque vescicole risultanti sono allineate lungo l'asse rostro-caudale dell'embrione e costituiscono la prima organizzazione del sistema nervoso centrale.

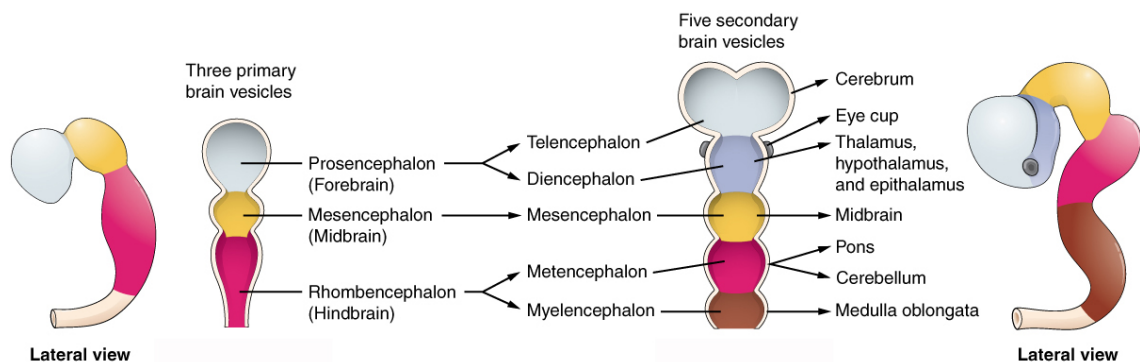


Figura 9. Schema della formazione delle 3 vescicole encefaliche primarie e del midollo spinale ed evoluzione allo stadio di 5 vescicole.

Queste modificazioni nella struttura dell'embrione riflettono un più profondo cambiamento nel *patterning* neurale che interessa tutte le regioni del sistema nervoso centrale embrionale. In particolar modo durante le fasi di gastrulazione e di neurulazione si determina l'organizzazione rostro-caudale e dorso-ventrale del tubo neurale in formazione. In seguito quest'organizzazione è modificata per opera del trasformatore (o organizzatore secondario) che, localizzandosi nelle zone di confine che separano due compartimenti cerebrali diversi, ha la funzione di regolare e guidare il differenziamento regionale dei tessuti adiacenti attraverso la secrezione di molecole di segnale che inducono l'espressione di geni regione-specifici (Echevarria et al., 2003). In questa fase dello sviluppo, le diverse vie del segnale e i morfogeni secreti dagli organizzatori hanno un ruolo fondamentale determinando l'identità posizionale dei diversi tipi cellulari e specificando il loro destino neuronale.

### 3. Regionalizzazione rostro-caudale del tubo neurale

La specificazione dell'asse rostro-caudale di ciascuna delle vescicole encefaliche ha luogo durante la gastrulazione ad opera del mesoderma dorsale e della notocorda che determinano la creazione di gradienti di morfogeni allo stadio della placca neurale. Secondo l'ipotesi dell'attivatore-trasformatore, il primo segnale, definito attivatore, secreto dal labbro dorsale del blastoporo nell'anfibio (o organizzatore) induce caratteristiche anteriori nelle cellule del neuroectoderma. In seguito, un secondo segnale, definito organizzatore secondario (o trasformatore), modifica le caratteristiche anteriori di una porzione del tubo neurale, permettendone in questo modo la posteriorizzazione e la definizione del romboencefalo e del midollo spinale. Questa ipotesi è supportata da evidenze che dimostrano come l'esposizione a Noggin, Cordina e Follistatina, prodotti dall'organizzatore, inducano la produzione di strutture anteriori del cervello.

In aggiunta all'azione anteriorizzante operata dal labbro dorsale del blastoporo, tre vie del segnale sono responsabili dell'attività dell'organizzatore secondario:

- via dell'acido retinoico
- via di Wnt/BMP
- via del FGF

La comunicazione molecolare tra i segnali degli FGFs, Wnt ed acido retinoico, è essenziale per lo sviluppo delle varie strutture (Vieira et al., 2010). Questi gradienti attivano, nei progenitori neurali, geni *target* specifici e inducono competenza locale per rendere le cellule suscettibili all'azione dei diversi morfogeni secreti dagli organizzatori.

L'acido retinoico è un morfogeno derivato dalla vitamina A, implicato nella regionalizzazione del romboencefalo. L'acido retinoico attraversa la membrana cellulare, si lega al recettore citoplasmatico RAR (*Retinoic Acid Receptor*) formando un complesso che trasloca nel nucleo e regola l'espressione genica attraverso il legame a specifiche sequenze localizzate nel promotore del gene *target* chiamate RARE (*Retinoic Acid Response Element*) (Maden, 2002) (Figura 10).

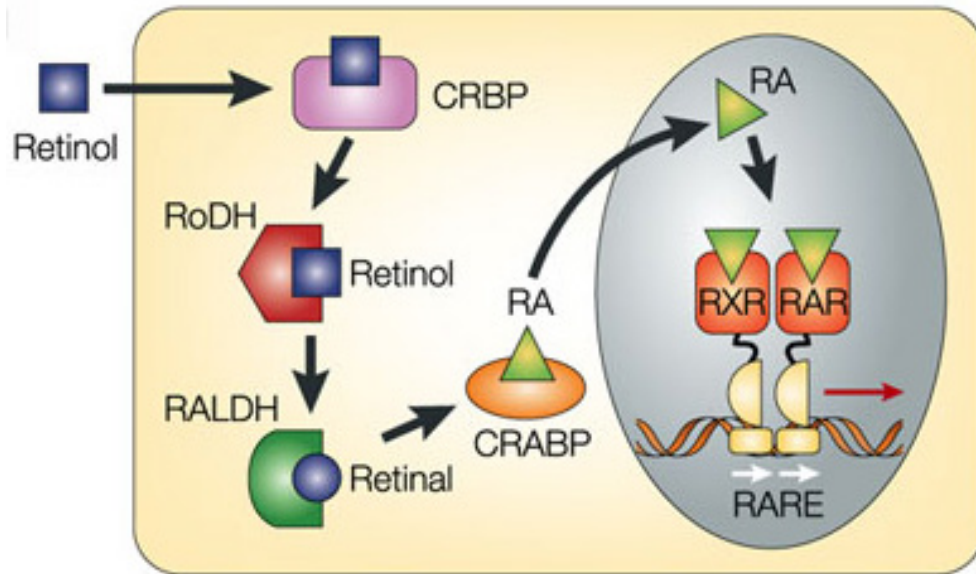


Figura 10. Rappresentazione schematica del *pathway* dell'acido retinoico (tratto da Niederreither and Dolle, 2008).

Nell'embrione di pollo allo stadio 4, la fonte di acido retinoico si trova a livello del mesoderma, che giace adiacente al tubo neurale, nel quale sono presenti gli enzimi per la sintesi. Durante l'embriogenesi l'acido retinoico diffonde nel romboencefalo e nel midollo spinale generando un gradiente di concentrazione che può arrivare a essere dieci volte maggiore nella regione posteriore rispetto a quella anteriore (*"Development of the Nervous System"*, 2005). L'azione dell'acido retinoico è esercitata mediante l'induzione dell'espressione dei geni Hox i quali sono espressi in specifici domini negli embrioni di mammifero ciascuno dei quali corrisponde a diverse posizioni lungo l'asse antero-posteriore (Figura 11). L'esposizione di embrioni di *Xenopus laevis* a concentrazioni crescenti di acido retinoico comporta il mancato sviluppo della testa come conseguenza dell'induzione dell'espressione dei geni Hox nella porzione anteriore del tubo neurale (da *"Development of the Nervous System"*, 2005).



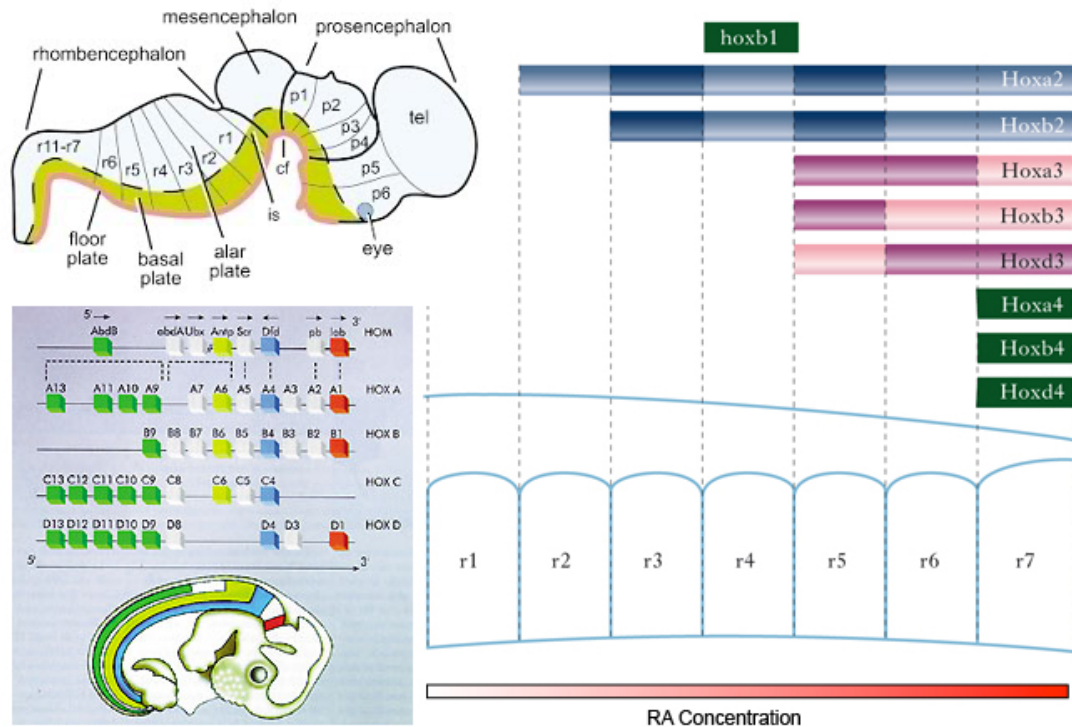


Figura 11. Azione dell'acido retinoico sull'espressione dei geni Hox e la posteriorizzazione del tubo neurale. Il gradiente di concentrazione dell'acido retinoico determina l'attivazione di geni specifici.

Le proteine Wnt sono glicoproteine caratterizzate da numerosi residui cisteinici conservati in grado di diffondere per brevi distanze dalla cellula che le ha secrete. Le proteine Wnt agiscono come molecole segnale in grado di attivare almeno tre vie intracellulari: *Wnt/β-Catenina*, *Wnt/PCP* e *Wnt/calcio*. La via più studiata è *Wnt/β-Catenina*, chiamata anche "via canonica" che interviene nella regolazione della proliferazione e sopravvivenza cellulare. In particolar modo durante il neurosviluppo regola (i) la proliferazione e il differenziamento dei neuroprogenitori corticali, (ii) la maturazione assonale del cervelletto e (iii) lo sviluppo della plasticità sinaptica nei neuroni ippocampali.

Una volta secrete nell'ambiente extracellulare, l'interazione tra le glicoproteine Wnt, il recettore *Frizzled* (FZD) e il co-recettore LRP5 e LRP6 (*LDL-Receptor-related Protein 5-6*), mediante l'attivazione della proteina citosolica *Dishevelled*, blocca la degradazione del complesso  $\beta$ -Catenina+Axin+GSK-3 $\beta$ +APC determinando un accumulo nel citoplasma di  $\beta$ -Catenina. Una parte della  $\beta$ -Catenina accumulata trasloca nel nucleo dove forma un complesso con la proteina TFC regolando così l'espressione dei *target* (Logan and Nusse, 2004) (Figura 12).

Considerando il ruolo svolto nel *patterning* antero-posteriore, le principali glicoproteine della famiglia di Wnt sono Wnt3 e Wnt8, espresse allo stadio precoce di gastrula con un gradiente di concentrazione che aumenta nelle regioni posteriori.

Lo sviluppo delle strutture anteriore richiede, al contrario, l'inibizione della via di Wnt da parte di fattori specifici quali sFRPs (*secreted frizzled related*), *Cerberus* e *Dkk* (*dickkopf*), espressi a livello del blastoporo.

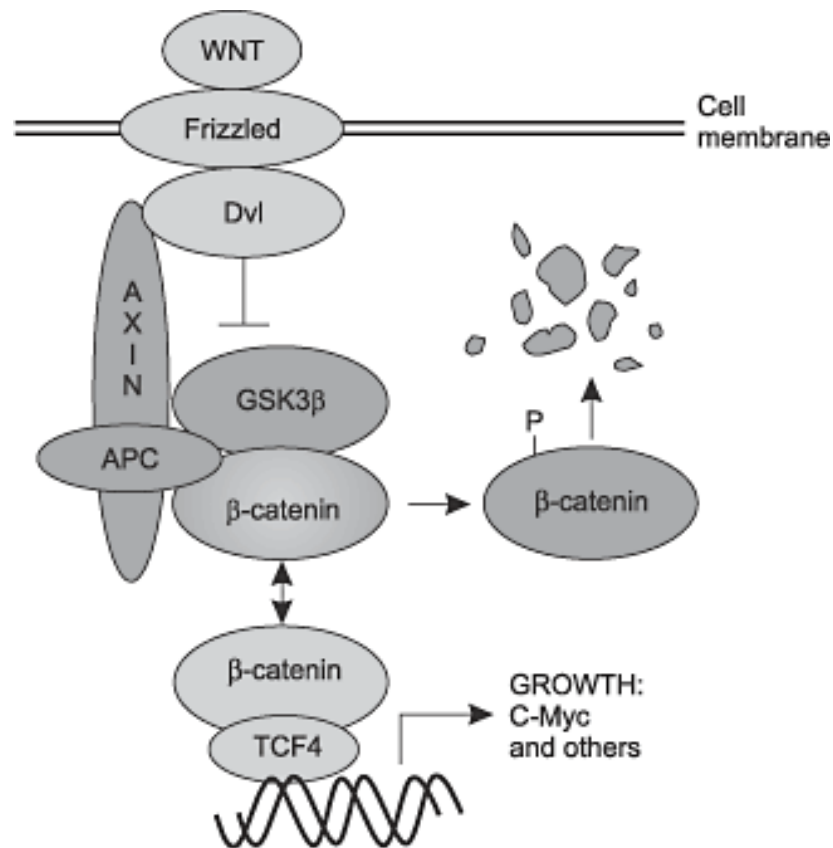


Figura 12. Rappresentazione schematica della 'via canonica' del *pathway* di *Wnt/β-catenina*, tratto da (Logan and Nusse, 2004). Il legame di Wnt con il recettore Frizzled attiva la proteina *Dishevelled*, la quale a sua volta inibisce la degradazione del complesso *β-Catenina+Axin+GSK-3β+APC* determinando un accumulo di *β-Catenina* nel citoplasma. La *β-Catenina* accumulata trasloca nel nucleo e regola l'espressione genica.

Dkk1/2/4 sono inizialmente espressi durante l'invaginazione del mesoderma, la loro espressione si restringe a livello del blastoporo durante lo stadio di gastrula, Dkk-3 è espresso a livello del blastoporo dorso-anteriore. sFRP2-like è espresso nel mesoderma anteriore allo stadio di gastrula. La diversa espressione di agonisti di Wnt posteriormente e quella degli antagonisti anteriormente, suggerisce che il *pathway* di Wnt sia coinvolto nella polarizzazione dell'asse posteriore a livello embrionale (da "*Development of the Nervous System*", 2005).

La via del TGF- $\beta$  (*Transforming growth factor- $\beta$* ) è coinvolta in diversi processi cellulari nell'embrione e nell'organismo adulto, ed è attivata da diversi ligandi tra cui il BMP. Durante la gastrulazione il *pathway* del TGF- $\beta$  è attivo in tutto l'ectoderma in seguito ad un rilascio di BMP dall'ectoderma stesso, mentre il mesoderma dorsale rilascia Noggin, Follistatina e Cordina che inibiscono l'azione del BMP garantendo l'induzione del neuroectoderma. La via del BMP ricopre un ruolo fondamentale anche nell'organizzazione dorso-ventrale del tubo neurale. I ligandi del recettore di BMP (BMPR), dopo la gastrulazione, sono espressi a elevati livelli ai margini laterali della placca neurale e nel tubo neurale dorsale creando un gradiente che induce l'espressione di marcatori indicativi della cresta neurale e di precursori neuronali dorsali. In particolare subito dopo la chiusura del tubo neurale, la precoce attivazione di BMP induce la formazione del *roof plate*, mentre l'equivalente attivazione durante il periodo tardivo della gestazione, induce la formazione di un dominio dorsale, valutabile con l'espressione del fattore di trascrizione Msx1 (Munoz-Sanjuan and Brivanlou, 2002).

*Fibroblast Growth Factors* (FGF) è una famiglia che comprende numerosi fattori di crescita coinvolti nell'angiogenesi, nel mantenimento dello stato indifferenziato delle cellule staminali embrionali umane (FGF4 e FGF8) e nello sviluppo embrionale (FGF8) (Nieto et al., 2001). FGFs sono induttori neuronali che, attraverso l'inibizione della fosforilazione di SMAD, bloccano la via del segnale del BMP (Figura 5) inducendo la formazione del neuroectoderma in associazione con gli inibitori del BMP Noggin, Follistatina e Cordina.

FGF8 è un esempio di segnale induttivo secondario che determina differenti risposte molecolari dipendentemente della localizzazione del centro di segnalazione responsabile della sua secrezione lungo l'asse antero-posteriore. Anteriormente FGF8 è prodotto dalla cresta neurale anteriore e induce l'espressione del fattore di trascrizione Foxg1, la cui espressione è fondamentale per l'acquisizione di un destino anteriore (da "*Development of the Nervous System*", 2005) (Figura 13). Al contrario, posteriormente, FGF8 riveste un ruolo fondamentale nel posizionamento del confine tra prosencefalo e mesencefalo regolando l'espressione di 3 geni: Wnt1, Engrailed-2 e Fgf8. L'espressione di Wnt1 e Engrailed-2 è essenziale per la formazione del cervelletto, come dimostrato da esperimenti con topi Wnt1<sup>-/-</sup> nei quali si verifica la mancata espressione di Engrailed-2 e l'assenza del cervelletto (Dickinson et al., 1994) (Figura 13).



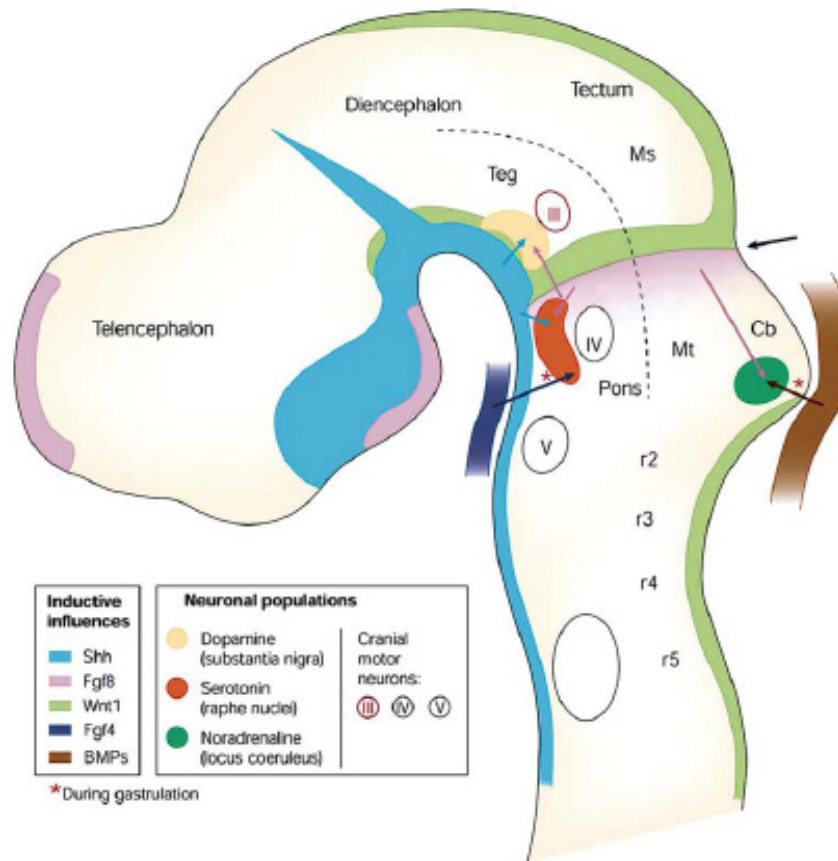


Figura 13. Localizzazione degli organizzatori secondari lungo l'asse antero-posteriore del tubo neurale.

La cresta neurale anteriore, oltre a secernere FGF8, è fonte d'inibitori di Wnt, la cui azione graduale regola il differenziamento delle strutture anteriori (Nordstrom et al., 2002; Houart et al., 2002). Nel prosencefalo, l'inibizione di Wnt induce l'espressione della famiglia di fattori *Sine-oculis homeobox* (Six). Tra questi Six3 reprime la trascrizione dei geni regolati da Wnt promuovendo la specificazione cellulare anteriore nelle zone che diventeranno prosencefalo e diencefalo (Lavado et al., 2008; Lagutin et al., 2003). Al contrario, il fattore di trascrizione *Iroquis homeobox* (Irx) è espresso in modo complementare a Six3 nelle regioni maggiormente caudali del futuro diencefalo e romboencefalo.

L'azione degli organizzatori secondari si traduce nell'espressione di specifici fattori di trascrizione lungo l'asse antero-posteriore del tubo neurale che descrivono, da un punto di vista molecolare, ciascuna porzione del sistema nervoso centrale in sviluppo (Figura 14).

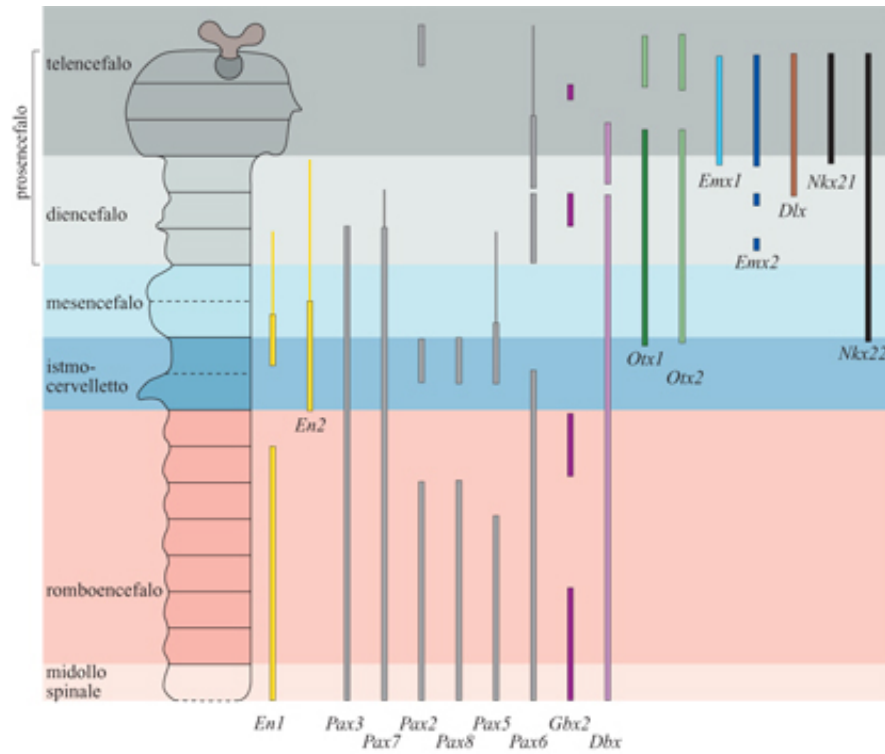


Figura 14. Principali fattori di trascrizione coinvolti nella regionalizzazione antero-posteriore del tubo neurale.

Al termine della 7<sup>a</sup> settimana di sviluppo nell'uomo la vescicola prosencefalica va incontro a un'ulteriore suddivisione originando il telencefalo e il diencefalo. L'azione di FGF8, degli inibitori di Wnt (Dkk-1, Cerberus), di Noggin e Cordinina determina l'espressione di una serie di fattori di trascrizione telencefalici quali Six3, Foxg1, Emx1, Hesx1, Lim1 e Otx2 (Lagutin et al., 2003; Lavado et al., 2008; Pannese et al., 1995).

## 4. Regionalizzazione dorso-ventrale del tubo neurale

Il tubo neurale, oltre ad essere segmentato lungo l'asse antero-posteriore, è polarizzato lungo l'asse dorso-ventrale.

La regionalizzazione dorso-ventrale è stata studiata approfonditamente nel midollo spinale, ma anche altre regioni del sistema nervoso centrale utilizzano meccanismi simili. La molecola più importante nella determinazione dell'orientamento dorso-ventrale è *Sonic Hedgehog* (SHH), il quale è secreto dalla notocorda e induce la formazione della lamina del pavimento (*floor plate*) del tubo neurale che a sua volta diventa una fonte di SHH. La *floor plate* diventa così un centro di segnalazione del tubo neurale stesso.

SHH è una proteina necessaria e sufficiente per lo sviluppo di strutture neurali ventrali e l'espressione di marcatori a esse associati, sia *in vitro* sia *in vivo* (Kohtz et al., 1998). Agisce come morfogeno generando un gradiente dorso-ventrale all'interno del tubo neurale, con concentrazioni maggiori a livello ventrale, al quale le cellule rispondono in maniera concentrazione-dipendente (Gunhaga et al., 2000) (Figura 15).

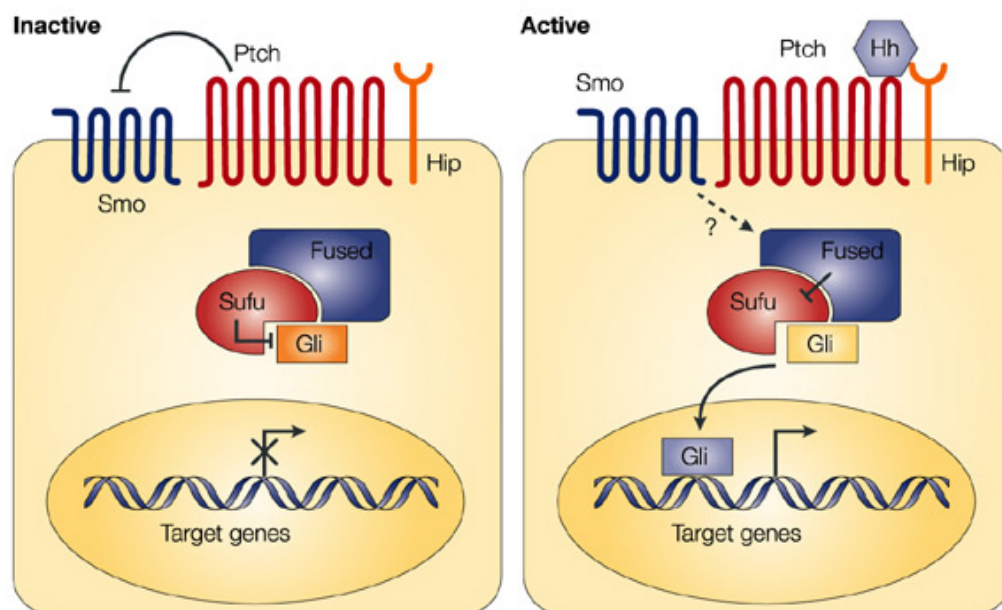


Figura 15. Rappresentazione schematica del *pathway* di Shh (tratto da Pasca di Modigliano and Hebrock, 2003).

La specificazione dell'asse dorso-ventrale del tubo neurale richiede, a livello dorsale, l'azione di un secondo fattore paracrino che contrasti l'azione ventralizzante di SHH. Questo secondo fattore è rappresentato dalle proteine BMPs, in particolare BMP4 e BMP7 prodotti dall'ectoderma dorsale. La loro secrezione determina la creazione di un secondo centro di segnalazione inducendo le cellule della lamina del tetto (*roof plate*) del tubo neurale. La *roof plate*, a sua volta, secerne BMP4. Come nel caso di SHH anche a livello dorsale si crea un gradiente di concentrazione di BMP4.

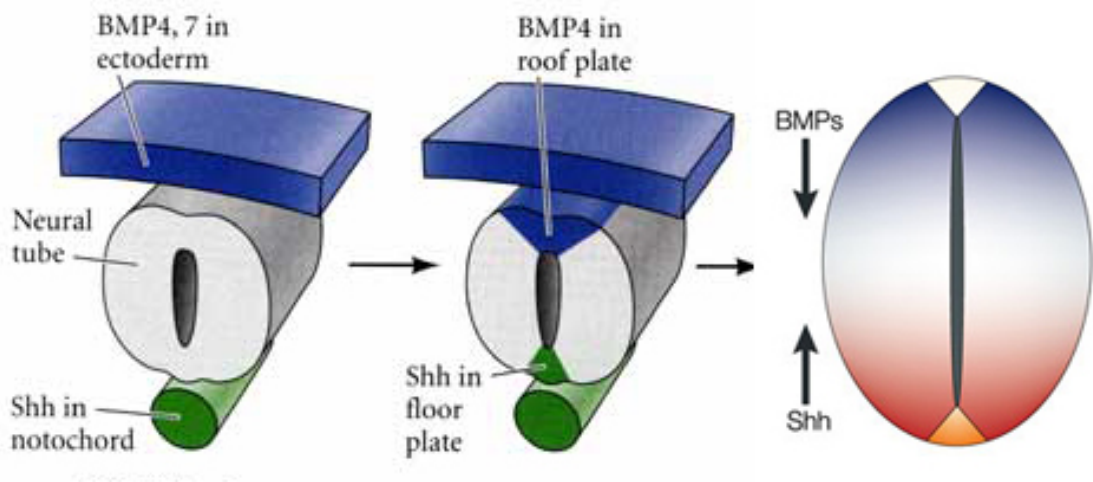


Figura 16. Rappresentazione schematica dell'azione di SHH e BMPs nella regionalizzazione dorso-ventrale del tubo neurale (modificata da Maden, 2002)).

L'antagonismo che si viene a creare tra i due gradienti contrapposti, quello di SHH dalla *floor plate* e quello delle proteine BMPs dalla *roof plate*, induce l'espressione di fattori di trascrizione differenti i quali a loro volta determinano la formazione dei diversi domini dorso-ventrali del tubo neurale (Figura 16).

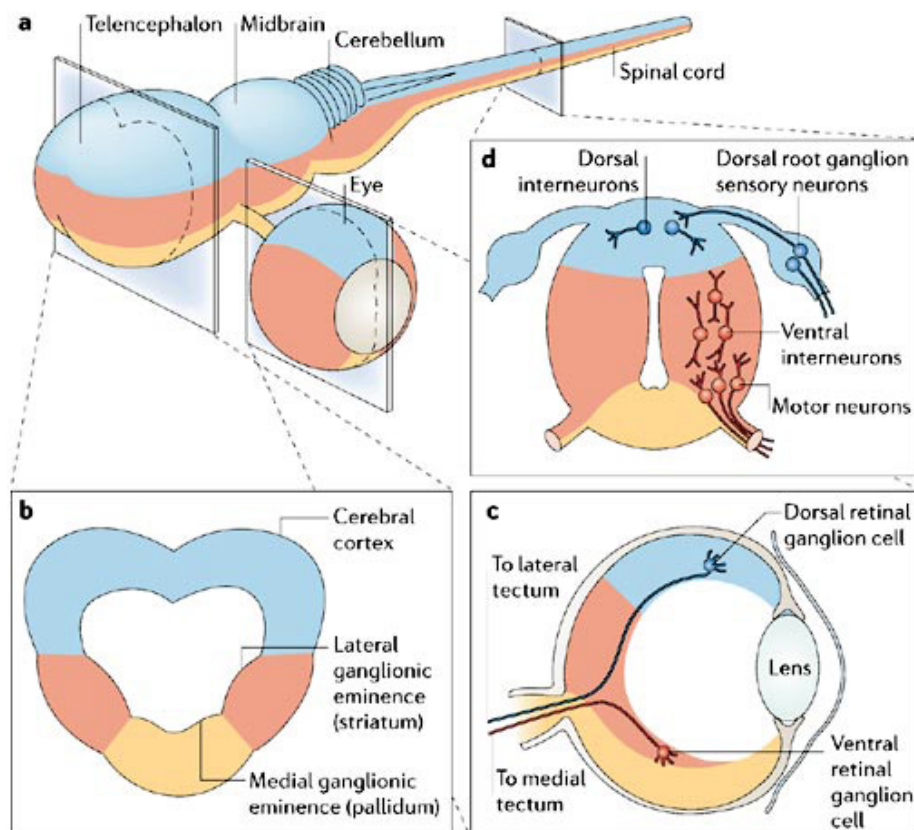


Figura 17. Schematizzazione della regionalizzazione dorso-ventrale del sistema nervoso (tratto da Lupo et al., 2006).

Ad esempio a livello del midollo spinale, le cellule adiacenti alla *floor plate*, che sono esposte a elevate concentrazioni di SHH e minime di BMP, esprimono i fattori di trascrizione NKX2-1 e NKX2-6 diventando neuroni ventrali (V3). Le cellule situate dorsalmente a queste, esposte a concentrazioni lievemente inferiori di SHH e, in parallelo, a maggiori livelli di BMP esprimono invece NKX2-6 e PAX6 diventando neuroni motori. I due gruppi successivi, esposti a concentrazioni sempre minori di SHH e crescenti di BMP, diverranno interneuroni V2 e V1 (Lee and Pfaff, 2001) (Figura 18).

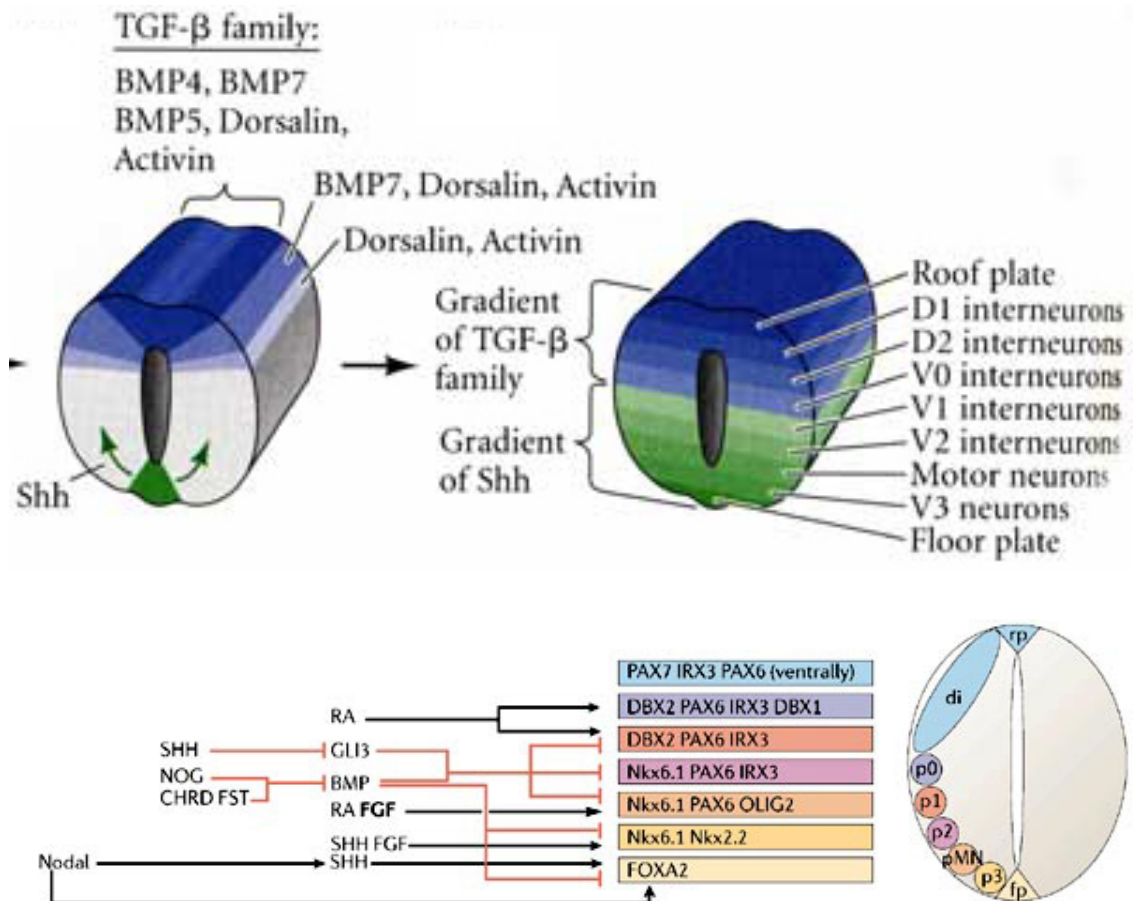


Figura 18. Schema dell'organizzazione dorso-ventrale della midollo spinale (modificata da (Lupo et al., 2006).

L'azione di SHH nell'indurre e organizzare strutturalmente la parte ventrale del tubo neurale si determina lungo tutta la lunghezza del tubo neurale stesso, risultando quindi responsabile anche del patterning dorso-ventrale del prosencefalo e della sua suddivisione in telencefalo dorsale (pallio), specificato dall'espressione di PAX6 e EMX1, e telencefalo ventrale (subpallio), specificato dalla presenza di NKX2-1 e GSX2 (Figura 19).

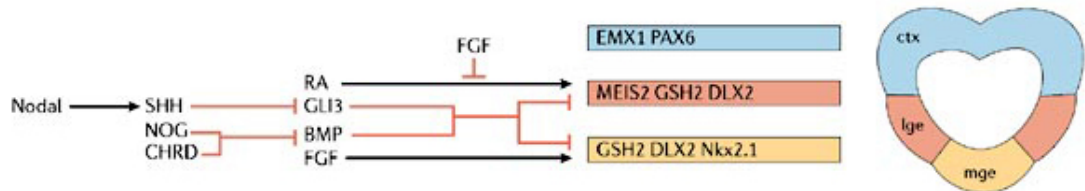


Figura 19. Schematizzazione delle vie del segnale e dei geni indotti dai morfogeni responsabili del patterning dorso-ventrale del telencefalo (modificata da Lupo et al., 2006).



## 5. Organizzazione del telencefalo: pallio e subpallio

Il telencefalo costituisce la porzione più anteriore del sistema nervoso centrale e, sulla base delle sue caratteristiche molecolari e funzionali, è suddiviso in una porzione dorsale, il pallio, ed una ventrale, il subpallio (Stiles and Jernigan, 2010).

Il telencefalo dorsale è costituito da due principali domini: la corteccia cerebrale, dalla quale originano la neo-corteccia e l'ippocampo, e il pallio mediale, da cui hanno origine il plesso coroideo e la *cortical hem*, un centro di segnalazione responsabile della secrezione di Wnt3 fondamentale per la formazione dell'ippocampo (Hebert and Fishell, 2008).

La principale popolazione neuronale che costituisce la neocorteccia è rappresentata da neuroni glutamatergici eccitatori, ai quali si aggiungono interneuroni inibitori GABAergici originati nel telencefalo ventrale e, in minima parte, anche dal pallio stesso (Hansen et al., 2013; Ma et al., 2013). In tutti i mammiferi, la corteccia si origina dai progenitori neuroepiteliali (NEP) proliferanti della vescicola telencefalica dorsale che rappresentano i diretti discendenti delle cellule della piastra neurale. Queste cellule costituiscono un epitelio pseudostratificato, definito zona ventricolare (VZ), in cui le cellule si dividono in maniera simmetrica, generando così due identici NEPs (Figura 20) (Rakic, 2009). La continua replicazione induce un aumento dello spessore della zona ventricolare, che è particolarmente evidente nell'uomo.

Dal giorno E33 nell'uomo ha inizio la fase di neurogenesi durante la quale i NEP si dividono in maniera asimmetrica, dando origine a un nuovo NEP e a un progenitore corticale che in seguito differenzierà a neurone glutamatergico. La generazione e l'accumulo di progenitori corticali portano alla formazione di un secondo strato della corteccia definito zona subventricolare (SVZ) (Figura 20) (Rakic, 2009; Stiles and Jernigan, 2010). La transizione da NEP a progenitore corticale è accompagnata da modificazioni nel set di fattori di trascrizione espressi. In particolare i NEPs esprimono PAX6, EMX2, FOXG1 e LHX2, mentre i progenitori corticali sono caratterizzati da una completa down-regolazione di questi geni e dall'espressione di nuovi fattori di trascrizione come TBR2, CUX1, CUX2, NGN2. Il progressivo spegnimento di PAX6 e la graduale accensione di TBR2 sono tipici della transizione da precursore a progenitore corticale (Bystron et al., 2008).

La zona subventricolare, come quella ventricolare, è una zona molto proliferativa che va incontro a un'enorme espansione durante lo sviluppo fetale umano, che permette di incrementare fortemente il numero di progenitori corticali e, di conseguenza, il numero di neuroni post-mitotici. Questo meccanismo è alla base del forte incremento dello spessore della corteccia umana rispetto a quella di qualunque altro mammifero (Bystron et al., 2008).

Alla 20<sup>a</sup> settimana di sviluppo, la presenza di fibre orientate tangenzialmente divide la zona subventricolare in una porzione interna (iSVZ) ed una esterna (oSVZ) ciascuna caratterizzata da uno specifico pattern di espressione SPECIFICARE MEGLIO!!! (Fietz et al., 2010). Parallelamente all'espansione della zona subventricolare si osserva

un assottigliamento della zona ventricolare, che si riduce a un singolo strato di cellule alla 25<sup>a</sup> - 27<sup>a</sup> settimana di sviluppo (Stiles and Jernigan, 2010).

I neuroni corticali post-mitotici migrano radialmente dalla zona ventricolare e subventricolare accumulandosi in uno strato posizionato al di sotto della pia. Durante le prime settimane questo strato è chiamato *pre-plate* (PP). La *pre-plate* è una struttura altamente dinamica e transiente, costituita da diversi tipi cellulari, molti dei quali andranno incontro a morte (Bystron et al., 2008) (Figura 20).

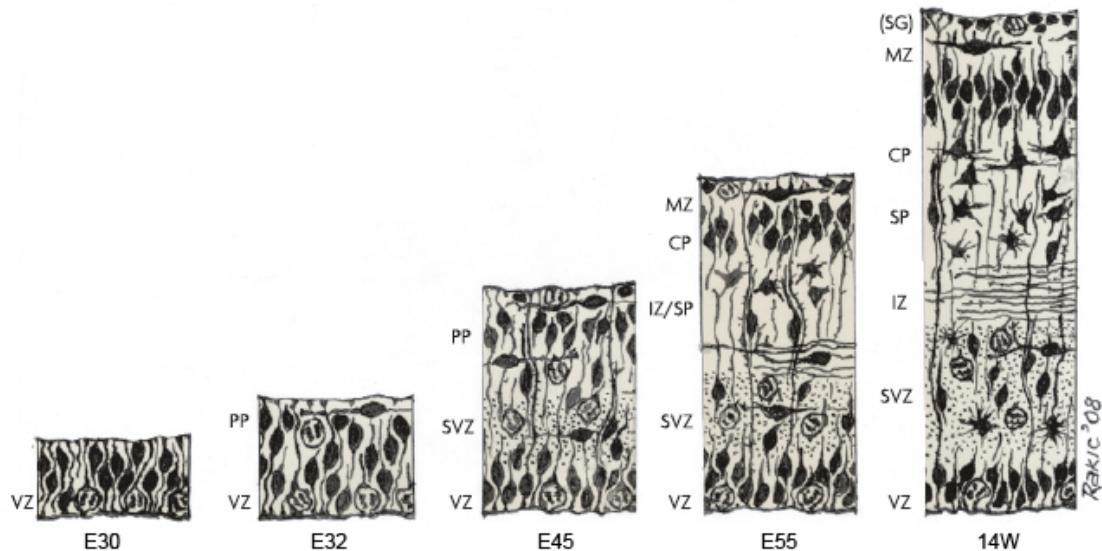


Figura 20. Schema dell'organizzazione della neo-corteccia umana dalla 4<sup>a</sup> alla 14<sup>a</sup> settimana gestazionale (Bystron et al., 2008).

Dalla 7<sup>a</sup> settimana nella corteccia umana si costituisce un nuovo strato, localizzato sopra la *pre-plate*, chiamato *cortical plate* (CP) dove si accumulano i neuroni migranti secondo un meccanismo *inside-out* (Figura 20 e 21). I primi neuroni a giungere nella *cortical plate*, derivanti dal differenziamento dei precursori neuroepiteliali della zona ventricolare, costituiranno lo strato VI della corteccia, quello più profondo. I neuroni più tardivi, prodotti dai progenitori corticali della zona subventricolare, costituiranno lo strato II, quello più superficiale. Il picco di migrazione neuronale avviene tra il 3<sup>o</sup> e il 5<sup>o</sup> mese di gestazione, per terminare durante il terzo trimestre della gravidanza. Al 7<sup>o</sup> mese la corteccia è costituita da 6 diversi strati (Figura 21).



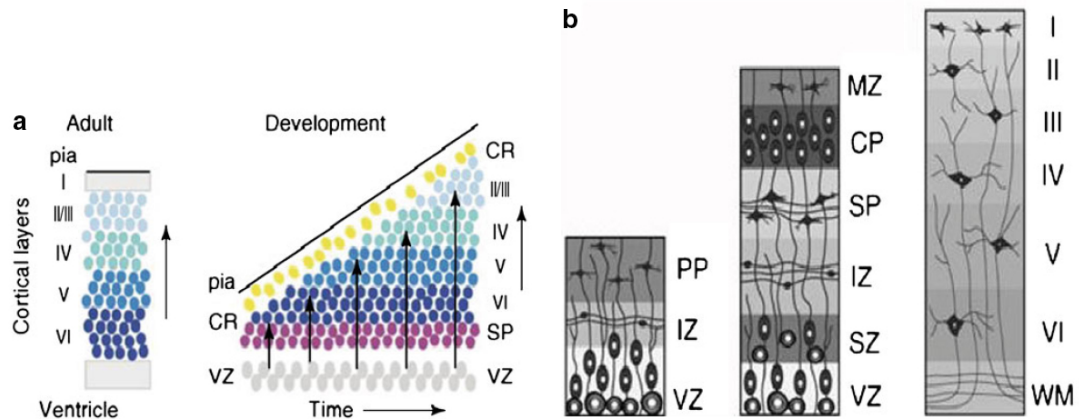


Figura 21. Migrazione dei neuroni corticali secondo il meccanismo *inside-out*.

Le cellule rimanenti della *pre plate* si localizzano sotto la *cortical plate* e contribuiscono alla formazione della *subplate* (SP), costituita da neuroni glutamatergici migranti e da interneuroni GABAergici (Figura 20) (Rakic, 2009). Infine, la porzione di corteccia situata tra la zona subventricolare e la *subplate* è definita zona intermedia (IZ) e contiene neuroni migranti, sia tangenzialmente sia radialmente. La divisione tra la zona intermedia e la *subplate* nell'uomo è ben evidente solamente dalla 9<sup>a</sup> settimana di sviluppo. Prima di questo momento si fa riferimento a questo compartimento della corteccia come IZ/SP (Bystron et al., 2008) (Figura 20). All'interno della neocorteccia matura, differenti popolazioni di neuroni di proiezione sono localizzate in diversi strati e aree corticali, e ciascuna mostra caratteristiche morfologiche uniche, esprime specifici set di fattori di trascrizione e svolge specifiche funzioni. La complessità e la diversità dei neuroni di proiezioni ha reso difficile la loro classificazione; numerosi studi di espressione genica sono stati effettuati, principalmente nel topo, ed hanno permesso di determinare l'espressione strato-specifica di numerosi fattori di trascrizione (Figura 22).

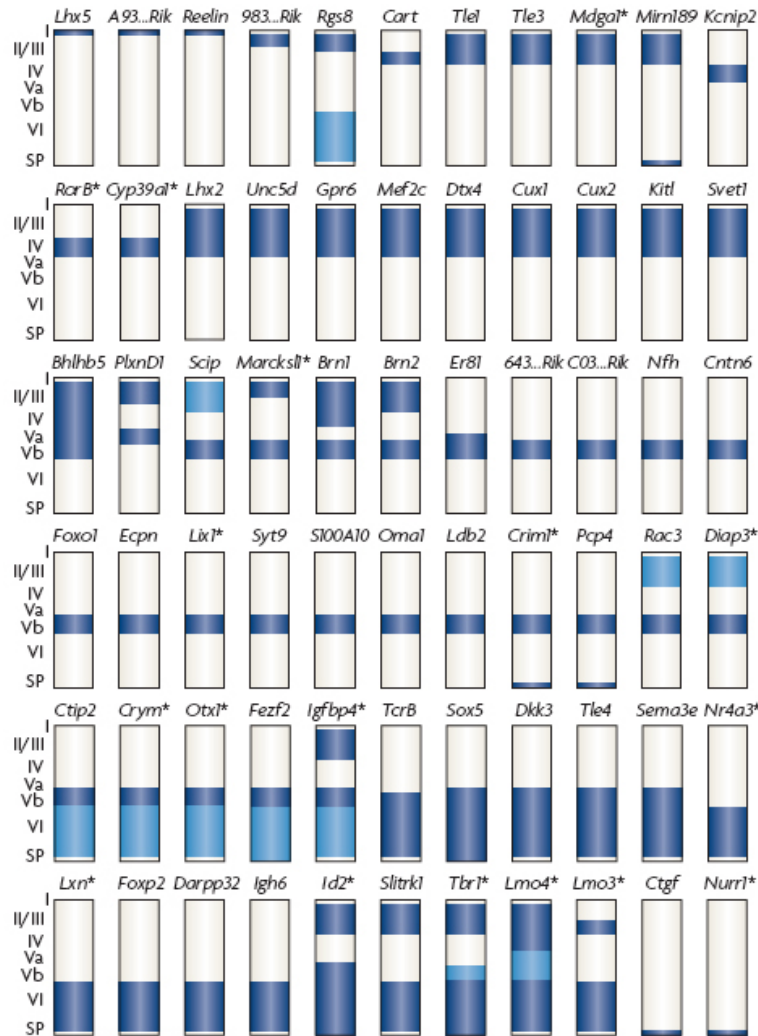


Figura 22. Schema riassuntivo dell'espressione corticale strato-specifica di diversi fattori di trascrizione nel topo (tratto da Molyneaux et al., 2007). I colori blu chiaro e blu scuro indicano rispettivamente un'espressione ridotta ed elevata.

Il telencefalo ventrale comprende le eminenze ganglionari, il setto e le regioni telencefaliche ventrali dei peduncoli cerebrali (Schuurmans and Guillemot, 2002) (Campbell, 2003).

Le eminenze ganglionari sono suddivise in tre diverse regioni (Figura 23):

- eminenza ganglionare laterale (LGE) localizzata a livello rostro-dorsale nel subpallio, confina con la corteccia laterale;
- eminenza ganglionare mediale (MGE) localizzata a livello rostro-ventrale;
- eminenza ganglionare caudale (CGE) localizzata a livello caudale.

LGE e MGE generano i due principali nuclei che costituiscono i gangli della base: lo striato e il globo pallido rispettivamente (Hebert and Fishell, 2008).

Lo striato è la principale stazione di afferenze del sistema dei gangli della base, i quali intervengono nel controllo dei movimenti volontari. Al contrario degli altri componenti del sistema motorio, essi non hanno una connessione *input-output* diretta con il tronco encefalico, ma ricevono i messaggi d'entrata dalla corteccia cerebrale e

dal talamo, e mandano efferenze, attraverso il talamo, alla corteccia motoria, premotoria, prefrontale e al tronco encefalico. Si ha quindi un'integrazione delle informazioni corticali da parte dei circuiti intrastriati e una ritrasmissione alla corteccia, tramite il talamo, dei messaggi fondamentali per il controllo motorio. L'importanza dello striato nella fisiologia del cervello è umana è sottolineata dall'esistenza di numerosi disordini neuropsichiatrici e neurodegenerativi causati da disfunzioni striatali come la Malattia di Huntington (Zuccato et al., 2010).

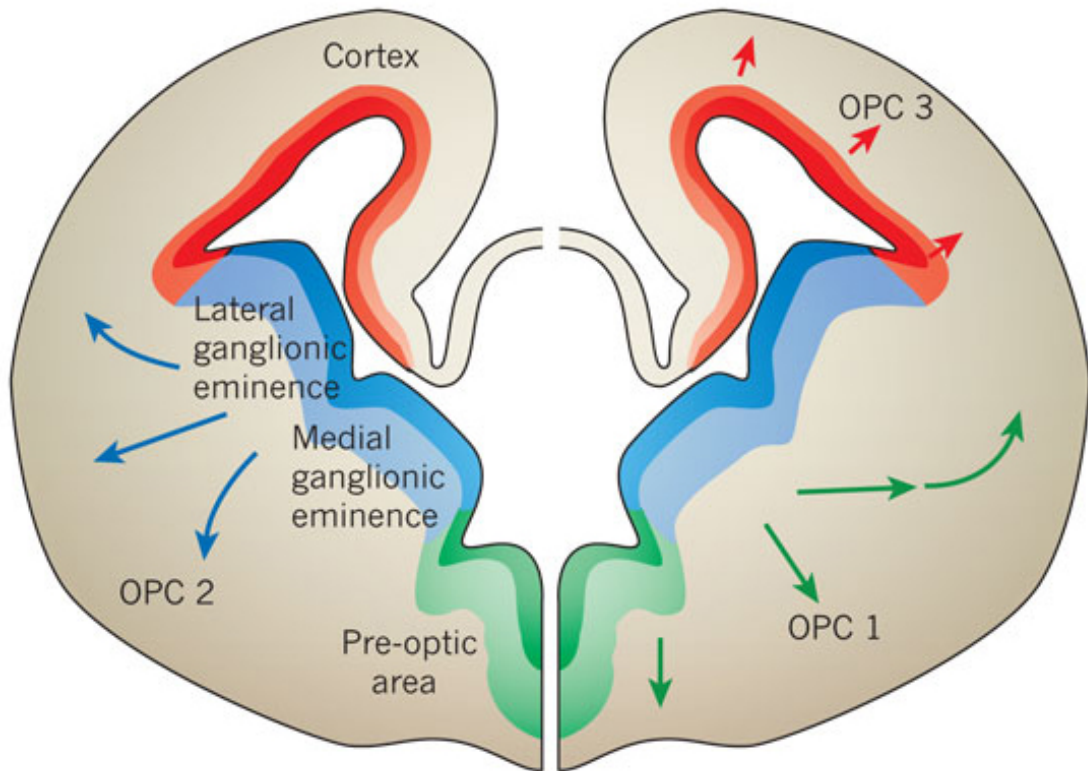


Figura 23. Schema dell'organizzazione del telencefalo ventrale.

Le eminenze ganglionari rappresentano la fonte principale di interneuroni inibitori GABAergici corticali e striatali. In particolare una popolazione di interneuroni migra dorsalmente da MGE, CGE e dalla porzione più dorsale della LGE (dLGE) dando luogo agli interneuroni corticali, mentre una seconda popolazione migra principalmente dalla MGE alla LGE originando gli interneuroni striatali (Anderson et al., 1997; Deacon et al., 1994; Olsson et al., 1995; Sussel et al., 1999; Wichterle et al., 2001).

Come in precedenza descritto per la neo-corteccia, anche il telencefalo ventrale origina dal neuroepitelio pseudostratificato della vescicola telencefalica. La divisione simmetrica dei NEP nella zona ventricolare origina le eminenze ganglionari; in particolare la MGE è la prima ad apparire durante lo sviluppo del telencefalo ventrale (Jain et al., 2001). Durante la fase neurogenica, la proliferazione dei NEPs determina la generazione della zona subventricolare in cui i progenitori striatali sono localizzati senza organizzarsi in una struttura epiteliale. L'espressione di specifici fattori di

trascrizione determina il passaggio dallo stadio di progenitore a quello di precursore post-mitotico. La divisione asimmetrica dei progenitori striatali produce neuroni post-mitotici che migrano lateralmente dalla subventricolare alla zona del mantello dove vanno incontro al differenziamento terminale e alla maturazione.

Nell'uomo lo striato inizia ad essere distinguibile a partire dalla sesta settimana di gestazione nell'uomo, uno stadio durante il quale in corteccia si sta sviluppando la subventricolare, ad indicare una maturazione del telencefalo ventrale più veloce di quello dorsale.

Lo striato è costituito da nucleo caudato (Ca) e putamen (Pu) separati dalla capsula interna (I.C.). Il 90% dei neuroni dello striato è costituito da neuroni striatali spinosi medi di proiezione (MSNs), i quali utilizzano come neurotrasmettitori l'acido  $\gamma$ -amminobutirrico (GABA), con azione inibitoria, e diversi neuropeptidi e sono caratterizzati da un corpo cellulare di 10-15 $\mu$ m di diametro dal quale dipartono diramazioni dendritiche irradiate. I MSNs che proiettano al segmento esterno del *globus pallidus*, costituiscono la via indiretta, ed esprimono l'encefalina come co-neurotrasmettitore; quelli che proiettano alla *substantia nigra* e al pallido, costituiscono la via diretta, ed utilizzano Sostanza P e dinorfina. Queste due popolazioni di MSN sono morfologicamente indistinguibili e non sono topograficamente segregate (Jain et al., 2001).

I neuroni di proiezione, oltre ad essere classificati sulla base del tipo di neurotrasmettitori utilizzati, possono essere distinti in accordo agli *input* corticali e ai *target* di proiezione in due diversi compartimenti: gli striosomi (o *patches*) e la matrice. In particolare, negli striosomi sono localizzati i MSNs che proiettano alla *substantia nigra pars compacta* del mesencefalo e ricevono gli *input* provenienti dall'amigdala e dalla corteccia limbica; la matrice contiene neuroni che proiettano al pallido e alla *substantia nigra pars reticulata* e ricevono *input* dalla corteccia associativa, oculomotoria, sensimotoria e dal talamo finiscono nella matrice. Matrice e striosomi si distinguono sulla base dall'espressione di specifici neurotrasmettitori e recettori. Gli striosomi sono caratterizzati da elevati livelli di recettori per oppiacei, Sostanza P, dinorfina, neurotensina e bassi livelli di acetilcolinesterasi (AChE); al contrario la matrice presenta alti livelli di calbindina, somatostatina, recettori per la neurotensina e AChE (Jain et al., 2001). Nel ratto striosomi e matrice sono generati in due momenti diversi dello sviluppo in seguito a due ondate di neurogenesi distinte, a partire da E12. Neuroni generati entro E17 costituiscono gli striosomi, mentre quelli generati dopo E18 e nel periodo post-natale producono la matrice. Nei roditori la genesi degli striosomi coincide con l'arrivo dell'innervazione dopaminergica dalla *substantia nigra* a E14 successivamente, entro E19, le fibre dopaminergiche si organizzano e si raccolgono in isole che costituiscono gli striosomi. La matrice, al contrario, si sviluppa più tardivamente indipendentemente dall'innervazione dopaminergica (Jain et al., 2001).

Il restante 10% dei neuroni striatali è costituito da interneuroni che possono essere raggruppati in quattro principali categorie:

- interneuroni colinergici;
- interneuroni GABAergici contenenti parvalbumina (PV);
- interneuroni GABAergici contenenti calretinina (CR);
- interneuroni GABAergici contenenti somatostatina (SOM), neuropeptide Y (NPY), monossido d'azoto sintetasi (NOS).

Come per i MSNs, gli interneuroni striatali ricevono afferenze glutammatergiche dalla corteccia e dal talamo; i segnali in uscita sono principalmente diretti ai MSNs e altri interneuroni (Kreitzer, 2009).

## 6. Profilo di espressione dei fattori di trascrizione che definiscono il telencefalo e lo striato

L'espressione e la co-espressione di fattori di trascrizione regione-specifici, indotta dall'azione dei morfogeni secreti durante il *patterning* del tubo neurale, determina l'organizzazione del sistema nervoso centrale nei diversi distretti che lo costituiscono prima, e la regionalizzazione del telencefalo successivamente.

**Otx2** (*orthodenticle homolog 2*) è uno dei geni più precoci ad essere espresso nel tubo neurale. *Otx2* è un gene di origine materna ed è stato identificato nei roditori come omologo del gene *orthodenticle*, un gene regolatorio che controlla lo sviluppo della testa in *Drosophila* (Pannese et al., 1995; Simeone et al., 1992). Nell'embrione di topo *Otx2* è espresso già nell'epiblasto e nell'endoderma primitivo al giorno di sviluppo E5.5. Tra E7 e E7.5 l'espressione di *Otx2* si restringe solamente nella regione anteriore dell'embrione dalla quale si originerà successivamente il neuroectoderma del telencefalo del mesencefalo. Negli stadi successivi dello sviluppo *Otx2* è espresso nelle regioni rostrali del cervello con una interruzione netta della sua espressione al confine mesencefalo/romboencefalo (Simeone et al., 1992; Simeone et al., 1993). Lo stesso pattern di espressione è presente anche nell'uomo (Larsen et al., 2010).

**Foxg1** (forkhead box G1, in precedenza conosciuto come BF-1) è un repressore trascrizionale espresso nella placca neurale anteriore che darà poi in seguito origine al telencefalo (Tao and Lai, 1992) (Figura 24).

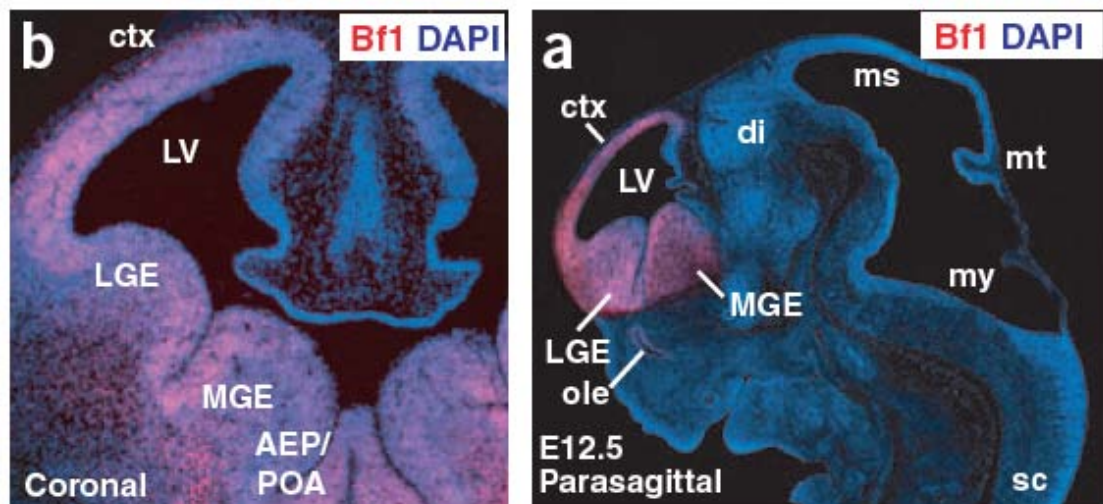


Figura 24. Espressione di Foxg1 (Bf1) nel telencefalo murino a E12.5 (tratto da Watanabe et al., 2005).



L'espressione di *Foxg1* induce la secrezione di Fgf8, e sua volta l'espressione di *Foxg1* è regolata da Fgf8. Topi *Fgf8*<sup>-/-</sup> sono caratterizzati da una ridotta espressione di *Foxg1* suggerendo l'esistenza di un feedback positivo tra i due (Hebert and Fishell, 2008).

L'espressione di *Foxg1* è fondamentale per il normale sviluppo del telencefalo; i topi *Foxg1*<sup>-/-</sup> sono caratterizzati da morte prenatale e da una severa ipoplasia del telencefalo dorsale, ma non di quello ventrale (Martynoga et al., 2005) (Figura 25). Queste evidenze dimostrano come *Foxg1* rivesta un ruolo di fondamentale importanza nel patterning dorso-ventrale del telencefalo (Martynoga et al., 2005; Xuan et al., 1995). L'azione ventralizzante operata da *Foxg1* è conseguente alla sua abilità di reprimere direttamente l'espressione genica delle proteine Wnt nel dominio ventrale del telencefalo, restringendo in questo modo l'azione di Wnt, secreto dalla *roof plate*, esclusivamente nel pallio (Danesin et al., 2009). *Foxg1* riveste, inoltre, un ruolo importante nella regolazione del ciclo cellulare dei progenitori telencefalici regolando l'espressione di PAX6 (Manuel et al., 2010).

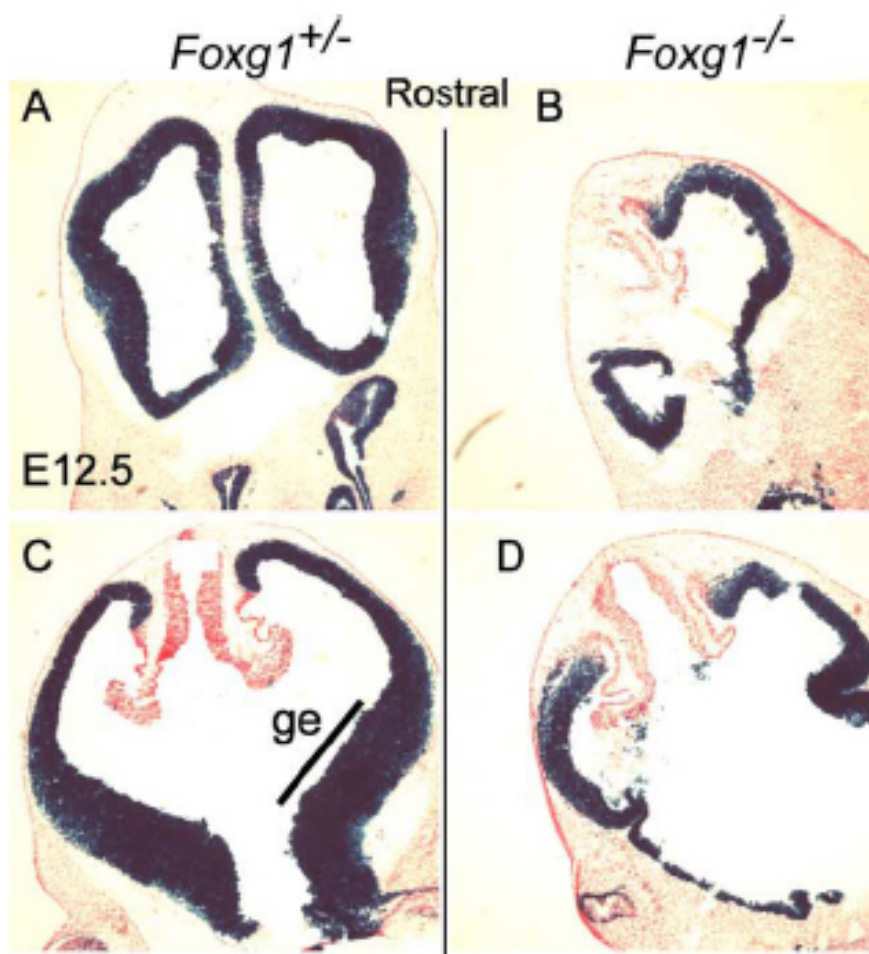


Figura 25. Anomalie morfologiche nel telencefalo di topi *Foxg1*<sup>-/-</sup> a E12.5. Da notare la ridotta dimensione del telencefalo e l'assenza delle eminenze ganglionari (tratto da Martynoga et al., 2005).

**PAX6** (Paired homeobox 6) è il primo marcatore di neuroectoderma ad essere espresso nell'uomo durante la neurulazione (Zhang et al., 2010). In seguito l'espressione di *PAX6* si restringe esclusivamente nei progenitori del telencefalo dorsale (Bayatti et al., 2008b), mentre è down-regolato nei precursori corticali della zona subventricolare (Englund et al., 2005). Topi *Pax6*<sup>-/-</sup> (detti anche *Pax*<sup>Sey/Sey</sup>) sono caratterizzati da una forte riduzione delle dimensioni del telencefalo dorsale (Caric et al., 1997; Kroll and O'Leary, 2005) conseguente ad una riduzione della proliferazione cellulare in quanto *Pax6*, controllando la proporzione dei nuovi progenitori prodotti che rientrano nel ciclo cellulare rispetto a quelli che ne escono e differenziano, regola la dimensione del pool di progenitori corticali della zona ventricolare (Quinn et al., 2007).

Parallelamente ad una riduzione del telencefalo dorsale e dell'espressione di geni corticali quali *Ngn2* e *Emx1*, i topi *Pax6*<sup>-/-</sup> sono caratterizzati da un'espansione del dominio di espressione di geni tipicamente ventrali quali *Gsx2*, *Ascl1* (precedentemente noto come *Mash1*) (Kroll and O'Leary, 2005; Stoykova et al., 2000; Toresson et al., 2000; Yun et al., 2001) (Figura 26).

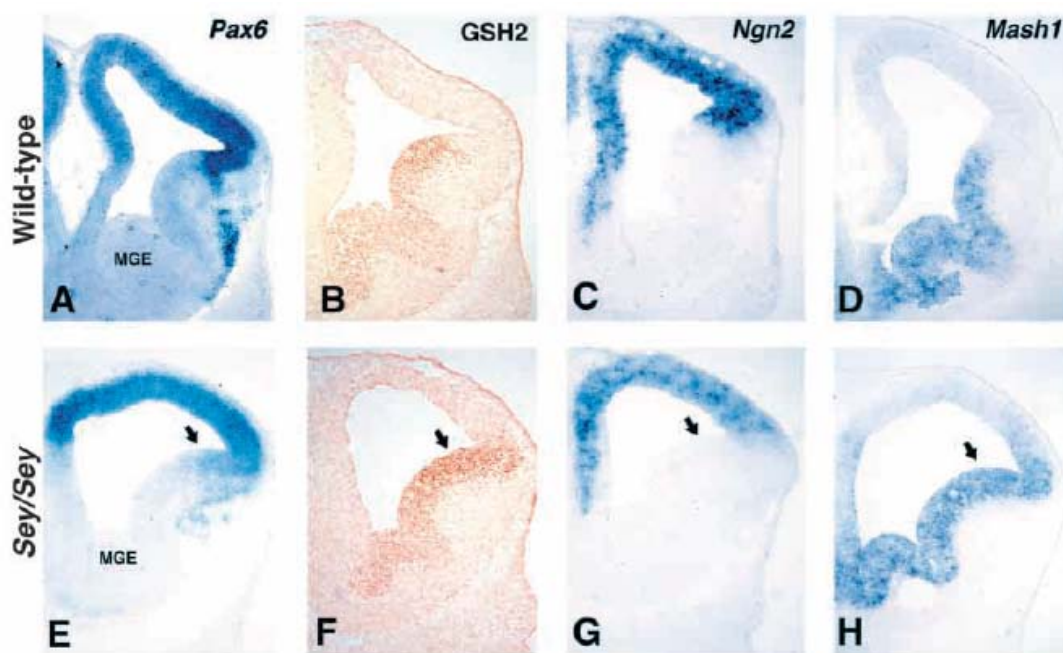


Figura 26. Sezioni coronali di telencefalo murino a E12.5. I topi *Pax*<sup>Sey/Sey</sup> sono caratterizzati da un'espansione dell'espressione di *Gsx2* e *Ascl1* nella porzione più ventrale della corteccia (ventral pallium, VP) a spese dell'espressione di *Pax6* e *Ngn2*, la cui espressione rimane detectabile nel pallio laterale e dorsale (tratto da Toresson et al., 2000).

**Gsx2** (GS homeobox2, in precedenza noto come *Gsh2*) è un fattore di trascrizione espresso nei progenitori neurali proliferanti del telencefalo ventrale la cui espressione è indotta da SHH (Corbin et al., 2000). *Gsx2* mostra un pattern di espressione complementare a quello di *Pax6*, delimitando così il confine molecolare tra pallio e subpallio (PSB) (Figura 27).



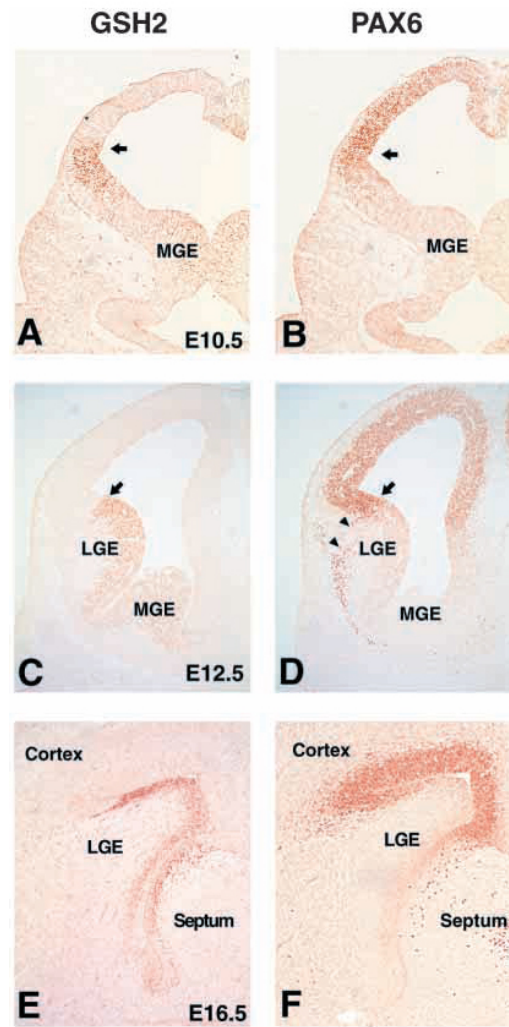


Figura 27. Sezione coronale di telencefalo murino a E12.5 mostra il profilo di espressione di Pax6 e Gsx2 (tratto da Toresson et al., 2000).

La corretta espressione di Gsx2 è fondamentale per l'espressione di numerosi geni che intervengono nella specificazione della LGE e per il normale sviluppo dello striato (Corbin et al., 2000; Szucsik et al., 1997; Toresson et al., 2000). Topi  $Gsx2^{-/-}$  sono caratterizzati da un'espansione del dominio di espressione del pallio ventrale (Pax6, Ngn2, Emx1) anche nella LGE e da una riduzione delle dimensioni dello striato (Corbin et al., 2000; Toresson et al., 2000) (Figura 29 e 29).

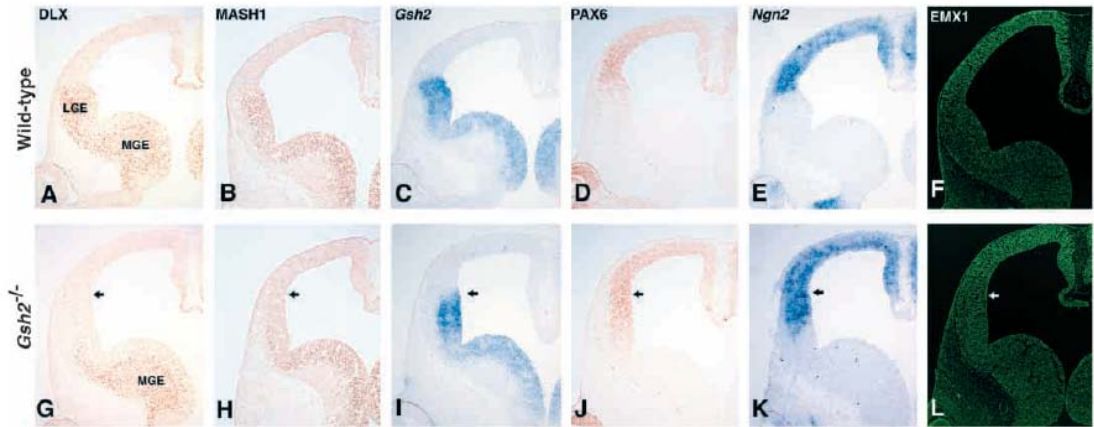


Figura 27. Sezione coronale di telencefalo murino a E12.5 mostra l'espansione dei domini di espressione dei geni dorsali *Pax6*, *Ngn2* e *Emx1* nel telencefalo ventrale ed un parallelo restringimento dell'espressione di *Gsx2* e *Ascl1* (tratto da Toresson et al., 2000).

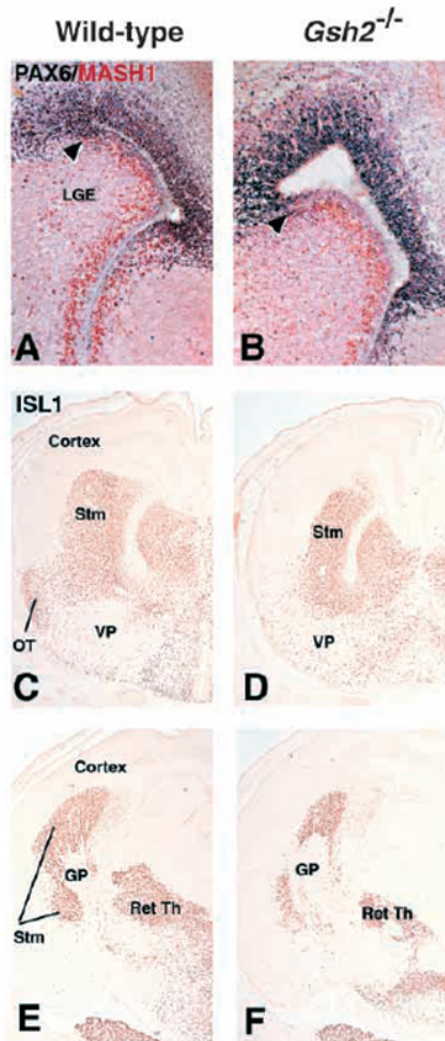


Figura 28. Ibridazione in situ per *Isl1* su sezione coronale di telencefalo murino a E16.5 mostra la forte riduzione delle dimensioni dello striato nei topi *Gsx2*<sup>-/-</sup> (tratto da Toresson et al., 2000).

**Ascl1** (achaete-scute complex homolog 1, in precedenza noto come Mash1), è un fattore di trascrizione pro-neurale che riveste un ruolo fondamentale nella specificazione dei precursori neuronali dei neuroni olfattori e dei neuroni noradrenergici del romboencefalo (Guillemot and Joyner, 1993; Guillemot et al., 1993; Hirsch et al., 1998). L'espressione di Ascl1, a livello del telencefalo ventrale, è posta sotto il controllo di Gsx2 ed è necessaria per il corretto *patterning* della LGE, l'acquisizione del fenotipo GABAergico (Fode et al., 2000) e il successivo sviluppo dello striato (Casarosa et al., 1999; Long et al., 2009b; Wang et al., 2009). Topi Ascl1<sup>-/-</sup> sono caratterizzati dalla persistenza di numerosi progenitori Gsx2<sup>+</sup> a E18.5, alcuni dei quali organizzati in cluster all'interno dello striato in conseguenza alla mancata espressione di Ascl1 che agisce, tramite un feedback negativo, reprimendo l'espressione di Gsx2 e permettendo in questo modo il differenziamento dei progenitori ventrali a precursori striatali (Wang et al., 2009). La mancata espressione di Ascl1 è inoltre responsabile di una riduzione dei livelli di espressione di geni striatali quali Foxp1, Darpp-32 e Calbinina (CB) anche se in misura inferiore a quello osservato nei topi Gsx2<sup>-/-</sup> (Casarosa et al., 1999; Wang et al., 2009) (Figura 29).

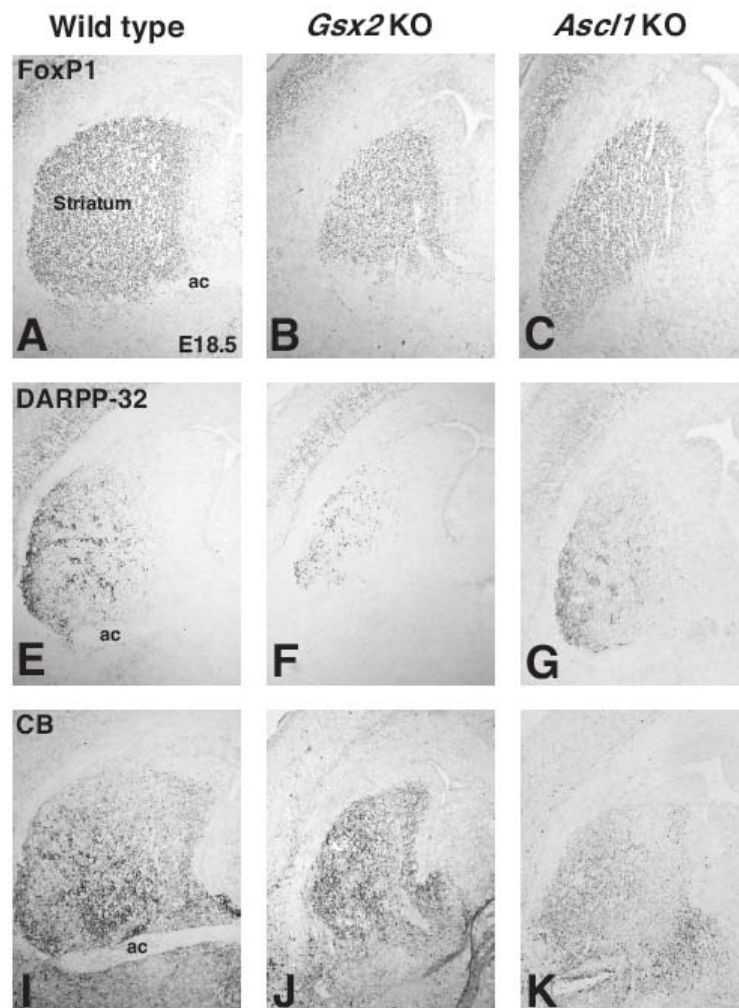


Figura 29. Sezione coronale di telencefalo murino a E18.5 mostrano una riduzione nell'espressione dei marker striatali *Foxp1*, *Darpp-32* e *Calbindina* (CB).

Questo ridotto impatto dell'ablazione di *Ascl1* sullo sviluppo striatale rispetto a *Gsx2* potrebbe essere conseguente all'azione compensatoria dovuta all'espressione di *Dlx1* e *Dlx2* (Long et al., 2009a). **Dlx1** e **Dlx2** (Distal-less homeobox 1 e 2) possiedono un profilo di espressione perfettamente sovrapponibile e sono entrambe co-espressi con *Ascl1* nei progenitori striatali nella SVZ della dLGE. I geni *Dlx1/2* sono sufficienti per promuovere il differenziamento GABAergico ed intervengono nella specificazione dello striato reprimendo l'espressione di geni dei progenitori (*Gsx2*, *Foxg1*, *Otx2*, *Ascl1*) e inducendo l'espressione di geni tipi dei neuroni striatali localizzati nella zona del mantello come *Dlx5* e *Dlx6* (Long et al., 2009a). Il ruolo fondamentale ricoperto da *Dlx1* e *Dlx2* nel differenziamento striatale è dimostrato dalla totale assenza di *Dlx5* e *Dlx6* e dalla riduzione dell'espressione di numerosi fattori di trascrizione striato-specifici come *Isl1*, *Foxp1*, *Foxp2*, *Lmo3*, *Lmo4*, *Meis1*, *Meis2*, *Six3* nei topi *Dlx1/2*<sup>-/-</sup> (Long et al., 2009a).

**Isl1** (LIM homeodomain 1) gioca un ruolo cruciale nel determinare diversi aspetti dello sviluppo neuronale nei vertebrati (Wang and Liu, 2001). In particolare nello striato di ratto, *Isl1* è caratterizzato da un profilo di espressione spazio-temporale molto dinamico. *Isl1* inizia ad essere espresso nel telencefalo ventrale a partire da E13 sia nella MGE che nella LGE. Da E15 a E20 l'espressione di *Isl1* è limitata, in associazione con il marcatore neuronale *Map2*, alla zona del mantello a suggerire un'accensione del gene solo dopo la migrazione dalla SVZ alla MZ. Da P0 si osserva una forte riduzione del numero di cellule *Isl1* positive nello striato, le quali co-esprimono il marcatore d'interneuroni colinergici *Chat* (Wang and Liu, 2001) (Figura 30).

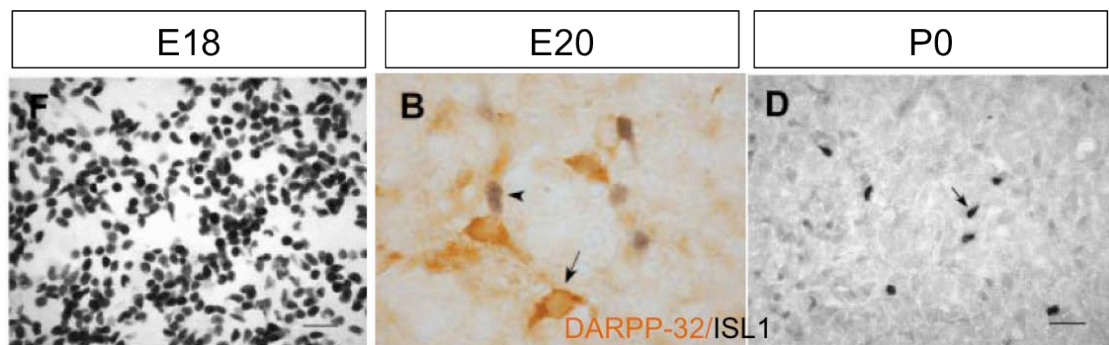


Figura 30. Profilo di espressione di *Isl1* durante lo sviluppo dello striato in ratto (Modificato da (Wang and Liu, 2001).

Durante lo sviluppo l'espressione di *Isl1* si restringe ad un numero ridotto di neuroni dello striato. In particolare analisi di co-espressione hanno dimostrato che l'espressione di *Isl1* è mantenuta solamente negli interneuroni colinergici provenienti dalla MGE, mentre nei neuroni striatali di proiezione *Darpp-32*<sup>+</sup> *Isl1* è completamente silenziato (Wang and Liu, 2001).



**Ebf1** (early B cell factor 1) gioca un ruolo essenziale nello sviluppo dello striato. Nel topo *Ebf1* è espresso da E11 a E17 nel mantello ed in alcuni progenitori post-mitotici nella zona subventricolare della LGE, mentre nella MGE è espresso solamente nel mantello. A E17 l'espressione di *Ebf1* nella MGE si riduce fino a scomparire, al contrario nello striato è mantenuta nella matrice fin dopo la nascita (Figura 31). Durante la seconda settimana di vita l'espressione di *Ebf1* nella matrice si riduce fino a non essere più espresso nell'adulto (Garel et al., 1999; Garel et al., 1997).

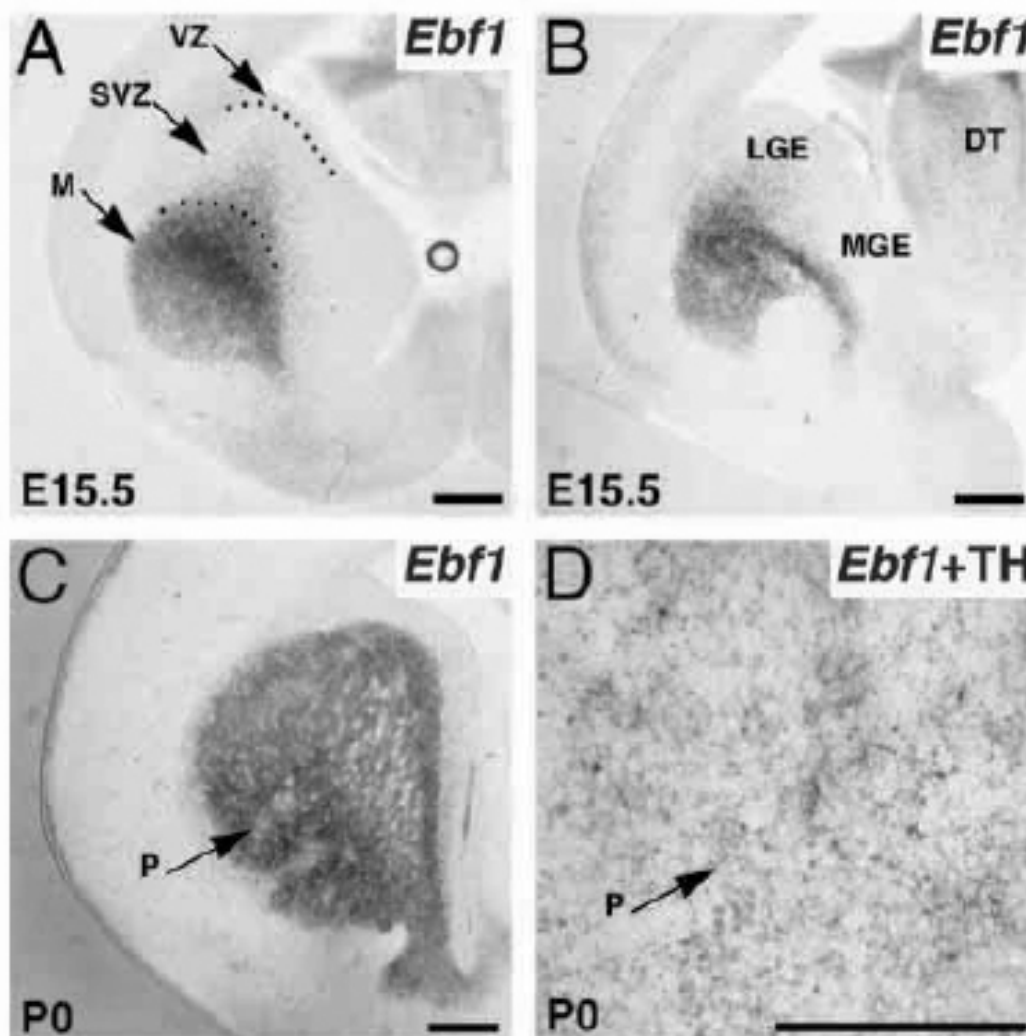


Figura 31. Espressione di *Ebf1* nello striato murino a E15.5 (tratto da Garel et al., 1999).

L'ablazione di *Ebf1* non ha effetti sulla formazione della LGE dimostrando che esso non ricopre un ruolo nel controllo della proliferazione dei precursori e progenitori ventrali della zona ventricolare e subventricolare (Garel et al., 1999). Al contrario nei mutanti si osservano una persistenza nell'espressione di marcatori SVZ-specifici e una riduzione della migrazione dei precursori post-mitotici dalla zona subventricolare al mantello che porta in seguito ad una forte ipoplasia dello striato ed a una alterazione nella sua forma (Garel et al., 1999).

**Foxp1** e **Foxp2** (Forkhead protein 1 e 2) sono caratterizzati da un profilo di espressione sovrapponibile nel telencefalo ventrale. Nel topo Foxp1 e Foxp2 iniziano ad essere espressi nei neuroni post-mitotici della LGE a partire da E12.5, con il procedere dello sviluppo la loro espressione interessa l'intero striato (Ferland et al., 2003) (Figura 32).

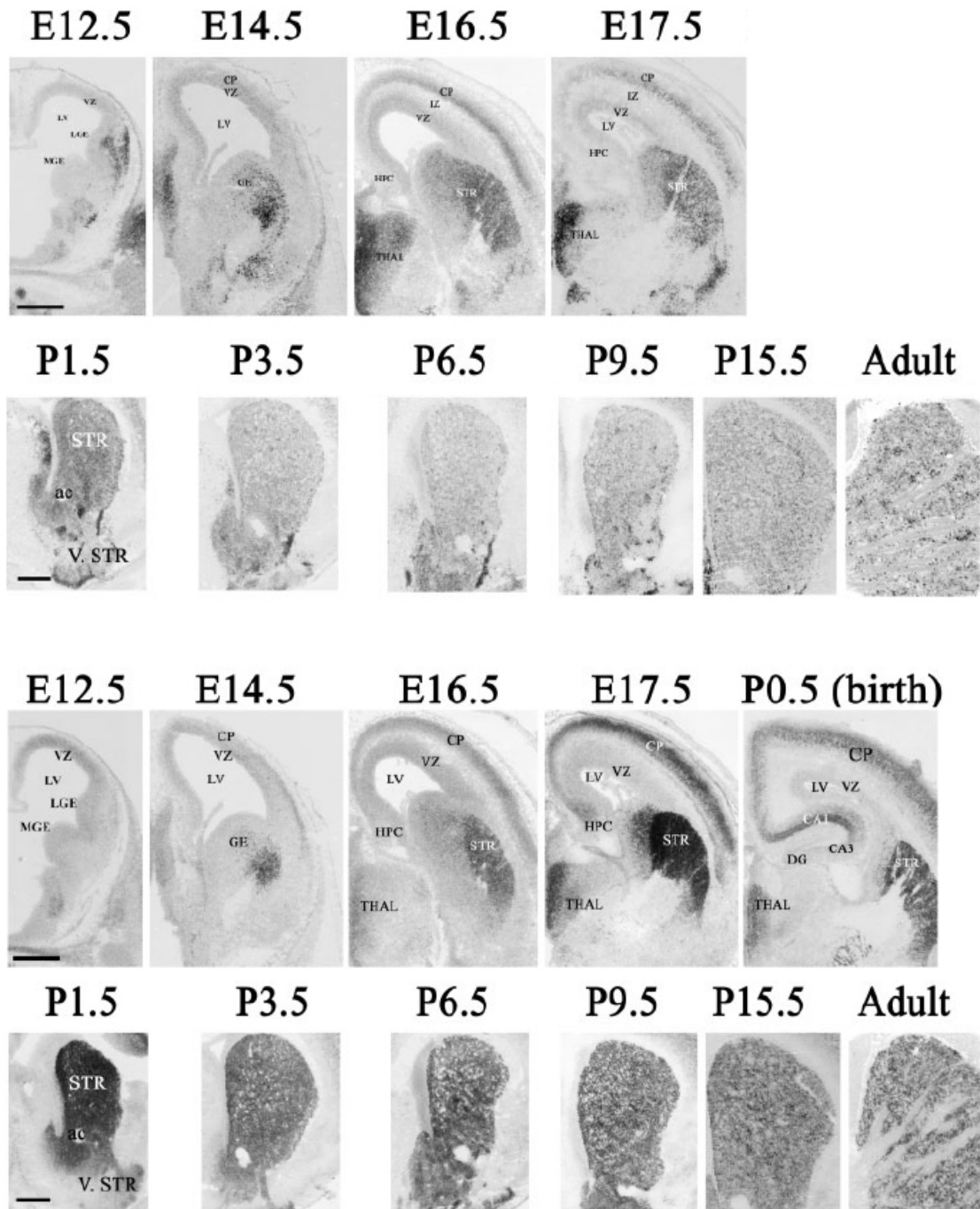


Figura 32. Sezioni coronali di telencefalo murino mostrano il profilo di espressione di Foxp1 (sopra) e Foxp2 (sotto) (tratto da Ferland et al., 2003).

Studi effettuati nel ratto e nella scimmia hanno descritto un'espressione di Foxp2 preferenzialmente negli striosomi del caudato, identificati dall'espressione striosoma-specifica della pre-pro-tachinina (PPT), ed una minore espressione negli striosomi del putamen (Takahashi et al., 2003; Takahashi et al., 2008). Foxp1, al contrario, è caratterizzato da un'espressione omogenea sia negli striosomi sia nella matrice del caudato e del putamen (Takahashi et al., 2003; Takahashi et al., 2008) (Figura 33). Entrambe i fattori di trascrizione presentano un profilo di espressione temporale, con una riduzione del segnale dopo la nascita (Takahashi et al., 2008).

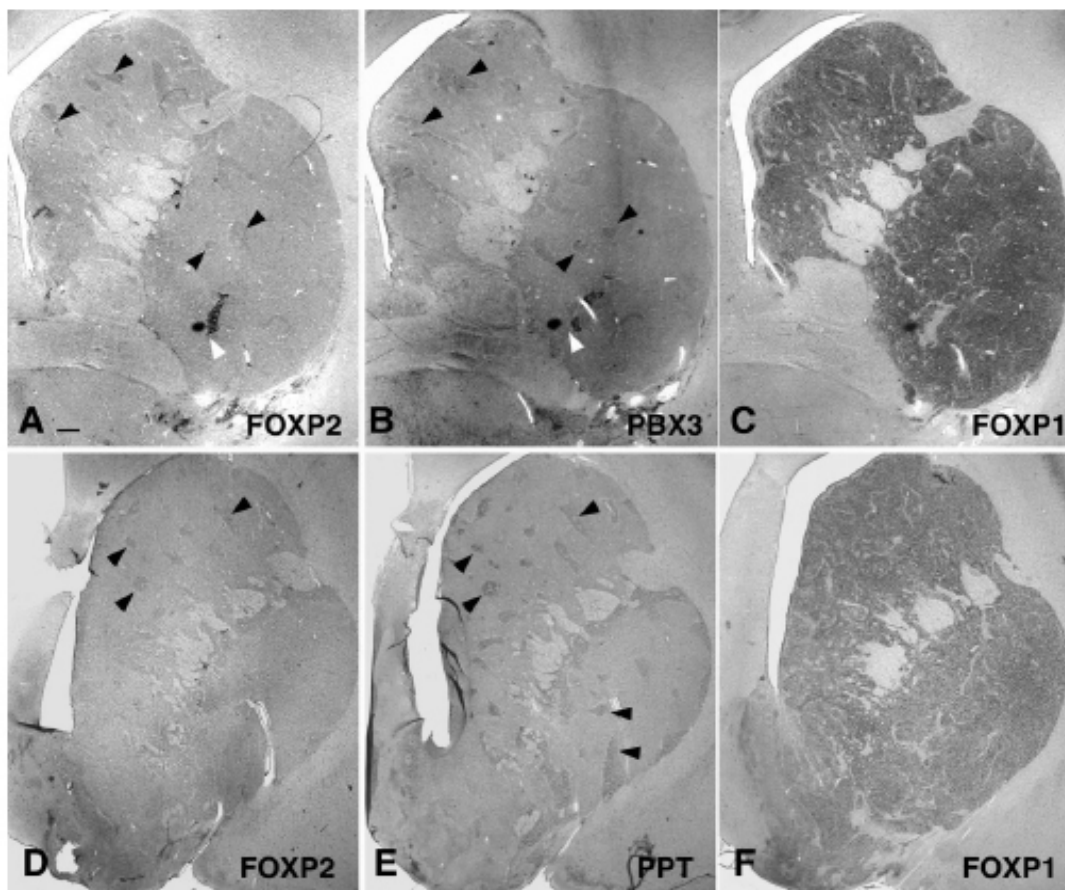


Figura 33. Profilo di espressione di Foxp2 e Foxp1 nello striato di scimmia prenatale (A-C) e post-natale (D-F) (tratto da Takahashi et al., 2008). Le frecce indicano l'espressione di Foxp2 a livello degli striosomi identificati dall'espressione di PBX3 e PPT. Foxp1, al contrario ha un'espressione omogenea che interessa striosomi e matrice.

Oltre che nello striato, Foxp1 e Foxp2 sono espressi anche nella corteccia. In particolare Foxp2 inizia ad essere espresso nella *cortical plate* murina a partire da E14.5. In seguito Foxp2 è espresso nello strato 6 della corteccia (Ferland et al., 2003; Hisaoka et al., 2010) (Figura 34). Al contrario Foxp1 è espresso negli strati 3, 4, 5 e 6 (Ferland et al., 2003; Hisaoka et al., 2010) (Figura 34).



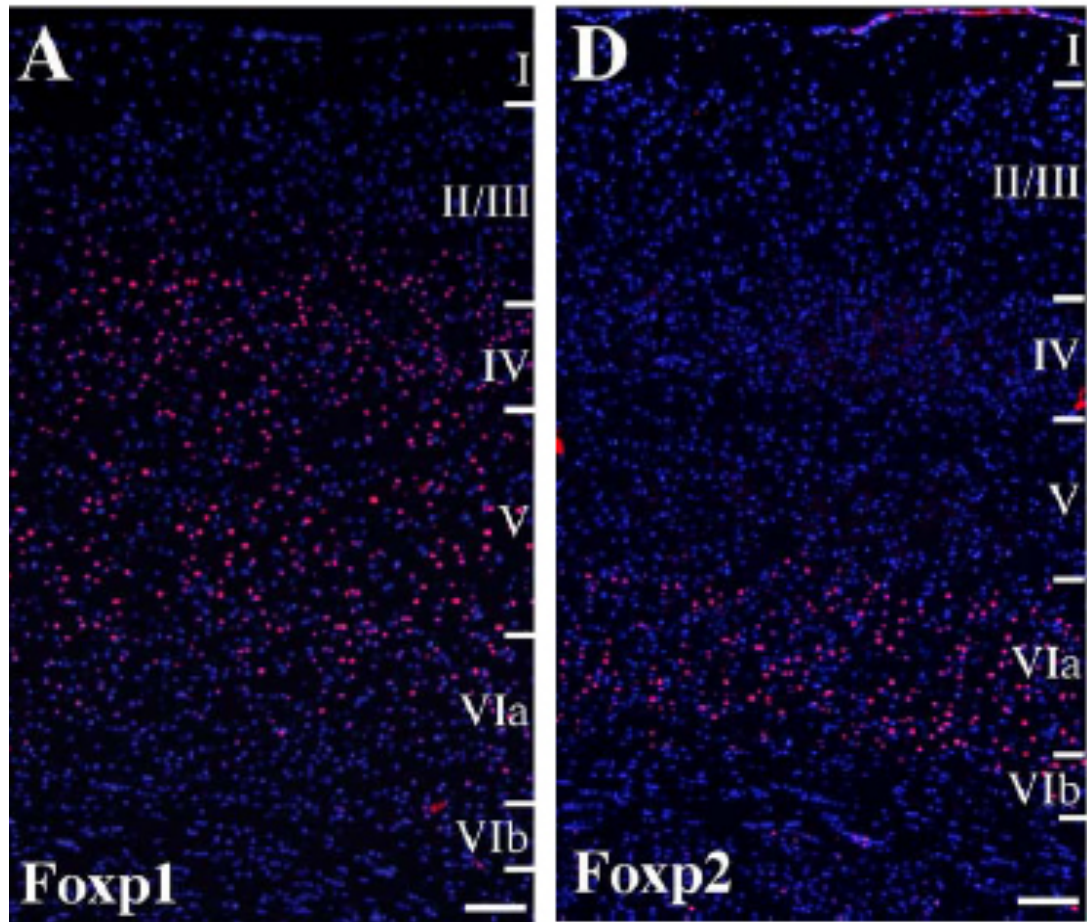


Figura 34. Profilo di espressione di Foxp2 e Foxp1 nella corteccia murina (tratto da Hisaoka et al., 2010).

**Nkx2-1** (Nk2 homeobox 1) è uno dei primi geni ad essere espressi nel telencefalo, analisi di ibridazione in situ hanno dimostrato la sua espressione nel topo a partire dallo stadio di 1 somite (Shimamura et al., 1995; Shimamura and Rubenstein, 1997). Allo stadio di 11 somiti l'espressione di Nkx2-1 è rilevata nel telencefalo ventrale per poi essere mantenuta nella MGE in parte del setto, nell'area pre-ottica (POA) (Sussel et al., 1999). Nella MGE Nkx2-1 è espresso sia nei progenitori e precursori proliferanti sia nei neuroni post-mitotici (Sussel et al., 1999) (Figura 35).

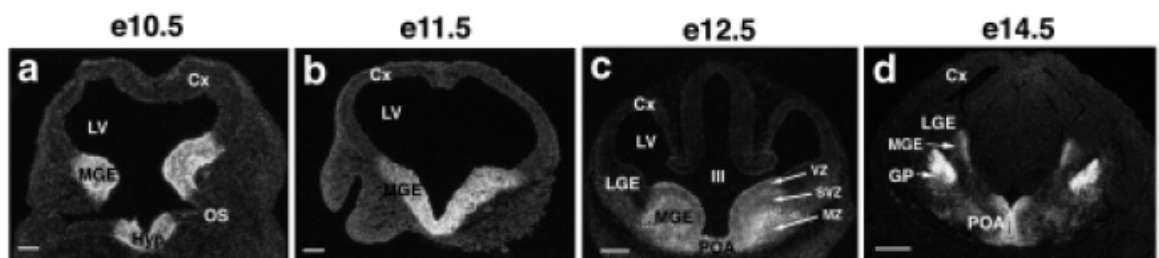


Figura 35. Profilo di espressione di Nkx2-1 nel telencefalo murino (tratto da Sussel et al., 1999).

L'espressione di Nkx2-1 è necessaria per la corretta definizione della MGE, del *globus pallidus* e del setto. La mancata espressione, infatti, determina una forte riduzione delle dimensioni della MGE e dell'espressione di geni tipici, come *Lhx6* e *Lhx7*, ed una conseguente espansione di marcatori tipici della LGE medialmente (Sussel et al., 1999).

La LGE è caratterizzata dalla totale assenza di Nkx2-1 (Figura 34) ad eccezione di un numero ridotto di cellule nella zona del mantello che compaiono a partire da E14.5 in seguito alla migrazione tangenziale dalla MGE degli interneuroni striatali (Hansen et al., 2013; Ma et al., 2013; Nobrega-Pereira et al., 2010; Sussel et al., 1999). Topi Nkx2-1<sup>-/-</sup> sono, infatti, caratterizzati dalla totale mancanza di interneuroni nello striato e nella corteccia (Sussel et al., 1999). Nello striato la quasi totalità degli interneuroni colinergici, il 90% degli interneuroni parvalbumina<sup>+</sup> e circa il 50% degli interneuroni Somatostatina<sup>+</sup> e neuropeptide Y<sup>+</sup> co-esprimono Nkx2-1 (Xu et al., 2008).

La destinazione finale degli interneuroni generati nella MGE è regolata dall'espressione di Nkx2-1. Durante la migrazione attraverso la zona ventricolare e subventricolare della LGE (Hansen et al., 2013; Ma et al., 2013) gli interneuroni corticali reprimono l'espressione di Nkx2-1 che viene in seguito nuovamente espresso a livello della corteccia (McKinsey et al., 2013; Nobrega-Pereira et al., 2010). Questa repressione trascrizionale è operata dal fattore di trascrizione Zfhx1b, la cui espressione è regolata da Dlx1 e Dlx2 (McKinsey et al., 2013). In assenza di Zfhx1, oppure in seguito ad una mancata repressione di Nkx2-1 gli interneuroni destinati alla corteccia si localizzano nello striato con conseguente riduzione della popolazione interneuronale della corteccia ed un aumento degli interneuroni nNOS/NPY/Sst<sup>+</sup> nello striato (McKinsey et al., 2013; Nobrega-Pereira et al., 2010).

Il mantenimento dell'espressione di Nkx2-1 negli interneuroni destinati allo striato garantisce la repressione dell'espressione di Neurofilina1 e Neurofilina2 (Nrp1, Nrp2), i recettori delle molecole repulsive semaforina 3A (Sema3A) e Semaforina 3F (Sema3F) normalmente espresse nello striato. In questo modo gli interneuroni striatali entrano nello striato mentre quelli corticali, che continuano ad esprimere Nrp1 e Nrp2, vengono respinti dall'azione repulsiva di Sema3A e sema3F e migrano fino alla corteccia (Nobrega-Pereira et al., 2010).

Nell'uomo l'espressione di NKX2-1 è stata rilevata anche nei precursori corticali della zona ventricolare e subventricolare e nella *cortical plate* a partire dalla 8<sup>a</sup> settimana di gestazione suggerendo che una parte degli interneuroni corticali ha origine nella corteccia stessa (Jakovcevski et al., 2011; Rakic and Zecevic, 2003).

**Ctip2** (noto anche come Bcl11b, B cell leukemia/lymphoma 11B) è un fattore di trascrizione la cui espressione interessa diverse regioni del sistema nervoso centrale, tra cui corteccia, ippocampo, bulbo olfattorio e striato (Arlotta et al., 2005; Leid et al., 2004). Nello striato Ctip2 è espresso in tutti i neuroni spinosi medi Darpp-32<sup>+</sup>/Foxp1<sup>+</sup> (Figura 36), ma non negli interneuroni striatali Somatostatina<sup>+</sup>, Chat<sup>+</sup>, Calretinin<sup>+</sup> o Parvalbumina<sup>+</sup> (Arlotta et al., 2008).

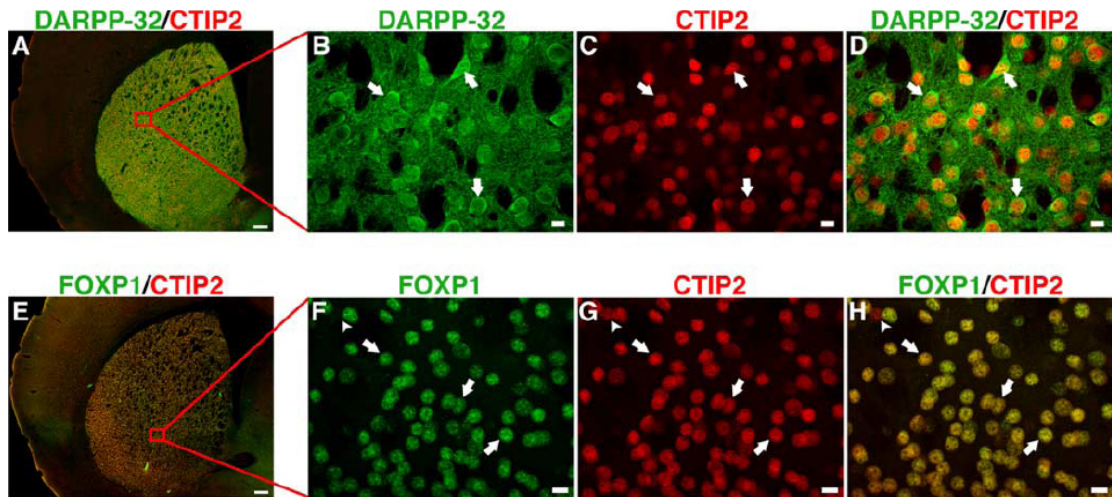


Figura 36. CtIP2 è espresso nello striato murino adulto in associazione con Darpp-32 e Foxp1 (tratto da Arlotta et al., 2008).

Durante lo sviluppo CtIP2 è espresso a partire da E12.5 nei neuroni striatali post-mitotici  $Dex^+$  nel mantello della LGE, ma non nei progenitori striatali della zona ventricolare o sub ventricolare (Arlotta et al., 2008). L'espressione di CtIP2 viene mantenuta ad elevati livelli anche nell'adulto. L'ablazione di CtIP2 non ha effetti sulla nascita e la migrazione dei neuroni striatali spinosi medi nonostante il loro differenziamento sia ridotto e lo striato sia altamente disorganizzato (Arlotta et al., 2008). In particolare è stata osservata una riduzione dell'espressione di Darpp-32, suggerendo un ruolo di CtIP2 nell'induzione dell'espressione di Darpp-32, e la mancanza degli striosomi (Arlotta et al., 2008). Darpp-32 (dopamine- and cAMP-regulated neuronal phosphoprotein, noto anche come PPP1R1B, protein phosphatase 1, regulatory (inhibitor) subunit 1B) è espresso nel 95% dei neuroni striatali spinosi medi e non è espresso da nessun'altri tipo cellulare dello striato (Gerfen et al., 1985; Ouimet et al., 1998; Ouimet et al., 1984).

## 7. Analisi bioinformatica di *class comparison* e di *de novo class discovery*

Lo sviluppo e il corretto funzionamento del cervello umano sono diretta conseguenza della regolazione spazio-temporale dell'espressione genica.

Lo studio del profilo globale di espressione genica del cervello umano durante lo sviluppo embrionale e fetale e dalla nascita fino all'età adulta ha permesso di iniziare a identificare i programmi genici che definiscono le diverse aree cerebrali, di disegnare i cambiamenti dei profili di espressione genica nel tempo e di esplorare l'organizzazione del trascrittoma e le relazioni di co-espressione genica (Kang et al., 2011; Johnson et al., 2009; Colantuoni et al., 2011; Oldham et al., 2008; Somel et al., 2010).

In questo lavoro di tesi sono state impiegate specifiche metodiche di analisi dei dati di espressione genica che possono essere suddivise in due principali categorie sulla base della procedura utilizzata.

L'analisi di *class comparison* si basa sullo studio dell'espressione differenziale dei geni tra gruppi di campioni predefiniti dall'operatore fin dal principio dello studio. Il risultato è una lista di geni differenzialmente espressi (DEG) tra i campioni appartenenti al gruppo A e quelli appartenenti al gruppo B. Nel nostro caso i geni differenzialmente espressi sono stati identificati confrontando il trascrittoma di striato con quello di corteccia.

Al contrario nella *de novo class discovery* i campioni non vengono suddivisi in gruppi (si lavora quindi senza un'ipotesi di partenza sulla classificazione dei campioni) e l'espressione genica viene valutata e analizzata su tutti i campioni nel loro insieme. Con questo metodo s'identificano tutti i geni, o insieme di geni, che presentano livelli di espressione diversi tra differenti gruppi di campioni. In particolar modo un gene può aver due livelli di espressione tra i campioni analizzati e avere, quindi, un andamento bimodale (Figura 37); nel caso in cui siano presenti tre livelli di espressione, si parlerà di geni trimodali. Solo in seguito all'identificazione dei geni s'inferisce il motivo per cui quel dato gene, o insieme di geni, presenta un'espressione differenziale tra i campioni. La causa di tal espressione bimodale può essere molteplice, ad esempio il tessuto di origine, il sesso o l'età gestazionale. Un gene bimodale rappresenta, di conseguenza, un candidato ideale per la discriminazione dei campioni in classi fenotipiche specifiche (Gormley and Tozeren, 2008).

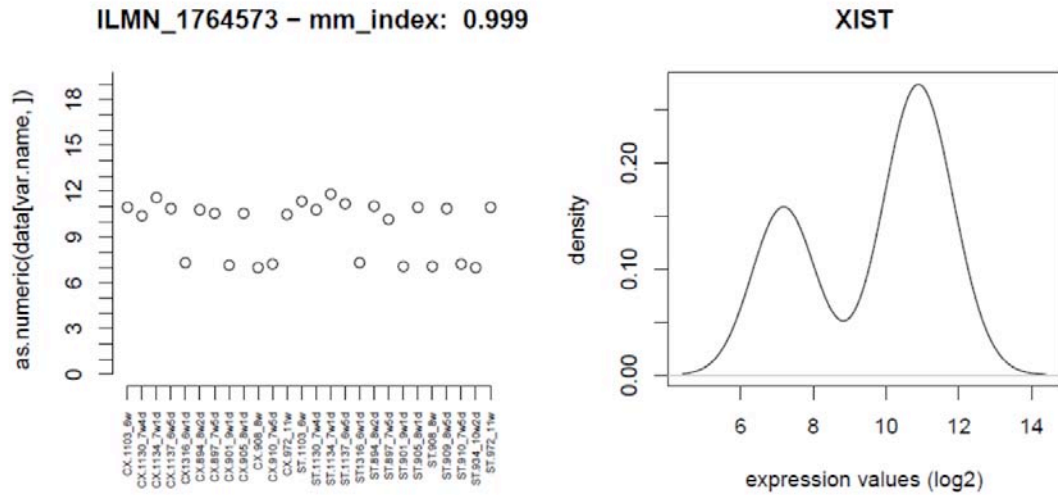


Figura 37. Esempio di gene bimodale che presenta due diversi livelli di espressione tra i campioni analizzati. Sulla base del tipo di gene e della categoria di campioni che esprime il gene si può inferire che l'andamento bimodale è dovuto al sesso degli embrioni da cui è stato estratto l'RNA. *XIST* è il gene responsabile dell'inattivazione del secondo cromosoma X, ed è quindi espresso esclusivamente nelle femmine.



## 8. *Weighted gene co-expression network analysis* (WGCNA)

L'analisi WGCNA è una nuova potente tecnica bioinformatica che permette di identificare i geni che possiedono un *pattern* di espressione tra loro sovrapponibile, perché co-espressi o la cui espressione genica è regolata in maniera analoga, all'interno di una popolazione di campioni (Oldham et al., 2008; Zhang and Horvath, 2005). I geni co-espressi sono organizzati in moduli.

Al contrario dell'analisi di *class comparison* questa strategia analizza tutti i geni espressi dai campioni senza nessun riferimento al livello di espressione del gene nei diversi campioni. In questo modo la WGCNA permette di superare la variabilità dell'espressione genica che inevitabilmente è presente tra i campioni biologici con lo scopo di identificare relazioni di ordine superiore tra i geni.

Per identificare i geni co-espressi l'analisi WGCNA investiga la relazione esistente tra tutte le possibili coppie di geni espressi, ottenendo in questo modo la cosiddetta *topological overlap* che descrive la similarità nel profilo di espressione delle coppie di geni. Geni co-espressi che appartengono allo stesso modulo sono caratterizzati da un elevato *overlap* topografico (Figura 38).

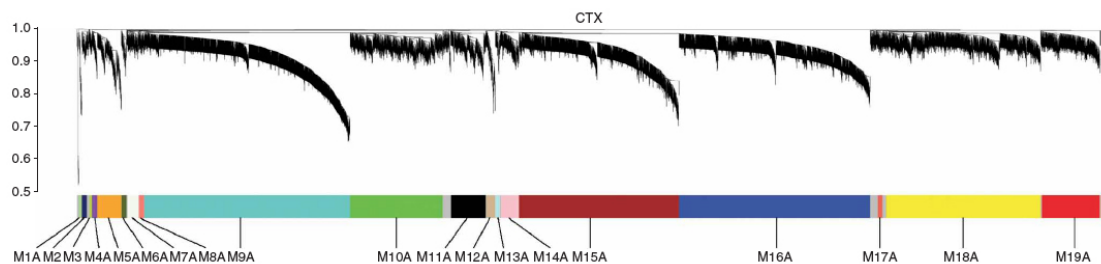


Figura 38. Esempio di *topological overlap* e di individuazione dei moduli (tratto da Oldham et al., 2008)

All'interno del modulo i geni sono chiamati nodi, e i nodi all'interno del modulo sono tra loro connessi. I nodi che possiedono una posizione centrale all'interno delle connessioni del modulo sono chiamati *hub genes* (Figura 39).

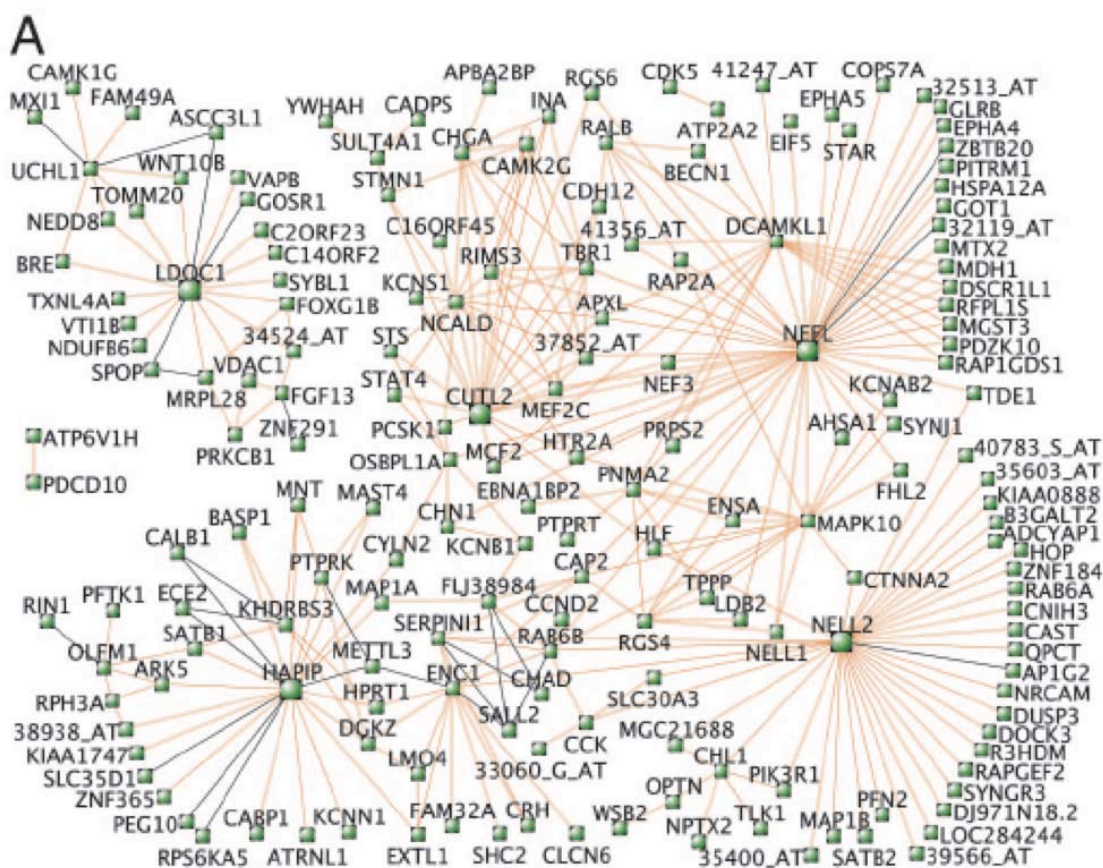


Figura 39. Esempio di Hub genes (tratto da Oldham et al., 2008)



## **RISULTATI**

### **1. Identificazione del corredo trascrizionale che determina l'identità dello striato umano durante la seconda metà del primo trimestre di sviluppo**

### 1.1 L'analisi di *class comparison* identifica i geni differenzialmente espressi che distinguono lo striato dalla corteccia

Grazie alla collaborazione con il laboratorio di Roger Barker presso l'Università di Cambridge abbiamo collezionato sedici campioni di tessuto striatale e quattordici di tessuto corticale a diverse età gestazionali comprese tra 6 e 11 settimane di sviluppo.

Da ciascuno di questi campioni è stato estratto l'RNA totale. 500ng di RNA sono stati utilizzati per produrre cRNA mediante il kit Illumina TotalPrep RNA Amplification Kit (Ambion); 750ng del cRNA marcato sono stati ibridati sul chip Illumina HumanHT-12 v4 (Illumina) che garantisce la copertura dell'intero trascrittoma umano, sia codificante che non codificante, per un totale di 47219 trascritti.

In seguito al controllo di qualità effettuato sui risultati dell'ibridazione, due coppie di campioni (BRC1319 e BRC1320) sono stati eliminati dall'analisi a causa della scarsa qualità del segnale che ha reso difficile distinguere il segnale delle sonde espresse dal rumore di fondo. Inoltre, per ridurre la variabilità proveniente da campioni diversi, i campioni non accoppiati (in cui striato e corteccia non provenivano dallo stesso feto), sono stati esclusi dall'analisi. In seguito a normalizzazione, 26629 sonde sono state identificate come espresse ( $p < 0.05$ ).

L'analisi dei geni differenzialmente espressi è stata, quindi, eseguita sulle 12 coppie di campioni appaiati rimanenti. In seguito a normalizzazione 26629 sonde sono state identificate come espresse ( $p < 0.05$ ). Di queste, 1032 geni sono risultati differenzialmente espressi, in particolare 685 geni sono up-regolati in striato e 347 geni in corteccia (Figura 40).

L'analisi di *unsupervised hierarchical clustering* ha evidenziato la presenza di 4 campioni (BRC908 CX, BRC897 ST, BRC1103 ST, BRC1103 CX) caratterizzati da un'espressione mista tra il *pattern* di espressione che identifica lo striato e quello di corteccia, riducendo in questo modo la significatività dell'analisi. Per questo motivo questi campioni, e i relativi campioni accoppiati, sono stati eliminati dall'analisi che è stata quindi eseguita su 9 coppie di campioni (Tabella 1).

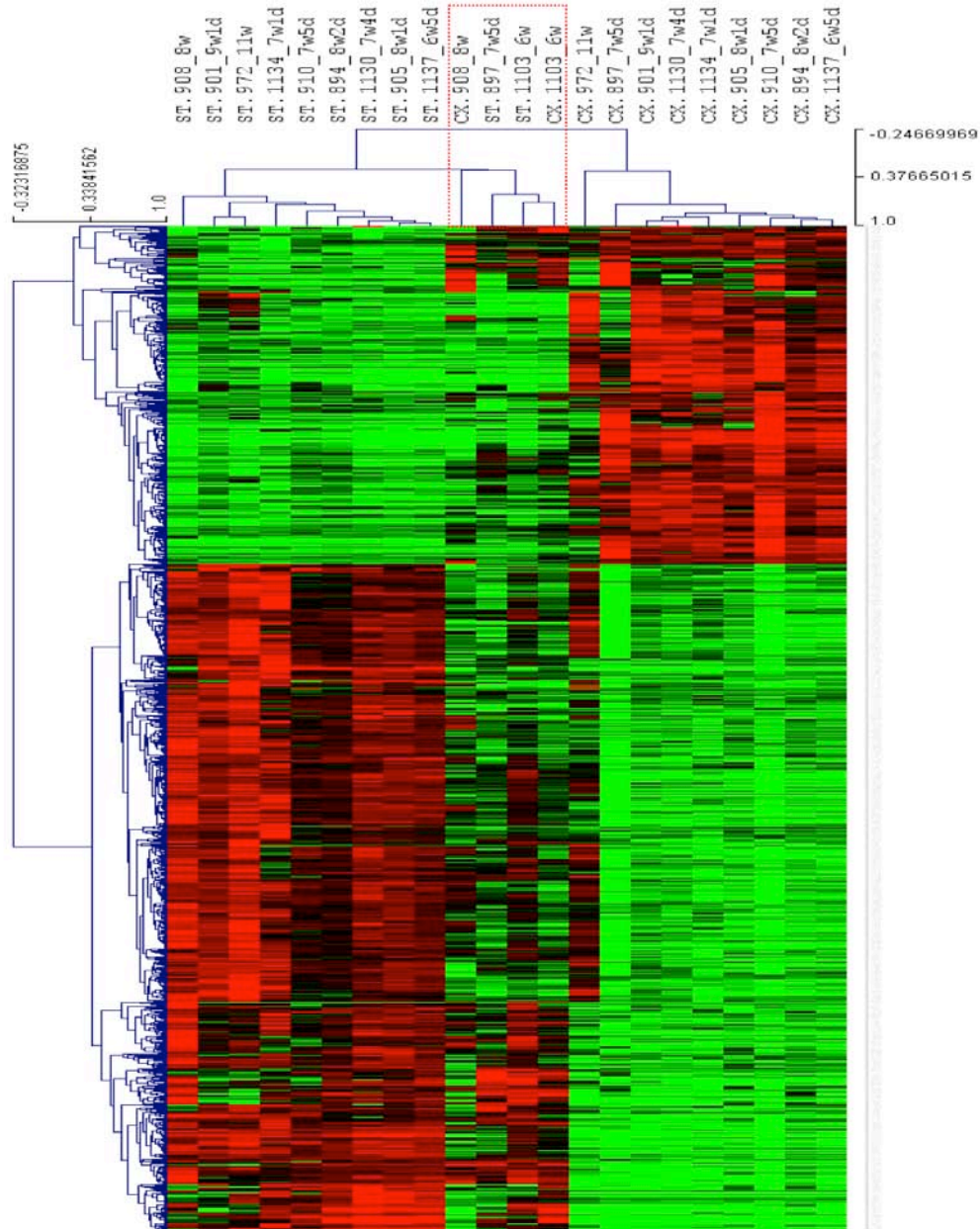


Figura 40. Schema dell'analisi di *unsupervised clustering* effettuata su 12 coppie di campioni. La direzione dell'espressione differenziale è rappresentata da un codice colore: il rosso indica la up-regolazione dell'espressione genica mentre il verde la down-regolazione in striato e corteccia rispettivamente. Il box rosso evidenzia i campioni caratterizzati da un'espressione mista.

	Sample ID	Tissue	Age	Paired Samples	Signal Quality	Notes
1	BRC1103	Striatum	6w 2d		good	mixed expression
2	BRC1316	Striatum	6w 2d		good	PCA/HCL
3	BRC1137	Striatum	6w 5d		good	PCA/HCL
4	BRC1134	Striatum	7w 1d		good	PCA/HCL
5	BRC1130	Striatum	7w 3d		good	PCA/HCL
6	BRC897	Striatum	7w 5d		good	mixed expression
7	BRC910	Striatum	7w 5d		good	PCA/HCL
8	BRC908	Striatum	8w		good	paired with BRC908 CX
9	BRC905	Striatum	8w 1d		good	PCA/HCL
10	BRC894	Striatum	8w 2d		good	PCA/HCL
11	BRC909	Striatum	8w 5d		good	PCA/HCL
12	BRC901	Striatum	8w 5d		good	PCA/HCL
15	BRC972	Striatum	9w 4d		good	PCA/HCL
13	BRC934	Striatum	10w 2d		good	PCA/HCL
14	BRC1320	Striatum	11w 3d		low	
16	BRC1319	Striatum	12w		low	
17	BRC1103	Cortex	6w 2d		good	mixed expression
18	BRC1316	Cortex	6w 2d		good	PCA/HCL
19	BRC1137	Cortex	6w 5d		good	PCA/HCL
20	BRC1134	Cortex	7w 1d		good	PCA/HCL
21	BRC1130	Cortex	7w 3d		good	PCA/HCL
22	BRC897	Cortex	7w 5d		good	paired with BRC897 ST
23	BRC910	Cortex	7w 5d		good	PCA/HCL
24	BRC908	Cortex	8w		good	mixed expression
25	BRC905	Cortex	8w 1d		good	PCA/HCL
26	BRC894	Cortex	8w 2d		good	PCA/HCL
27	BRC901	Cortex	8w 5d		good	PCA/HCL
28	BRC972	Cortex	9w 4d		good	PCA/HCL
29	BRC1320	Cortex	11w 3d		low	
30	BRC1319	Cortex	12w		low	

Tabella1. Elenco dei campioni di RNA utilizzati per di espressione differenziale.

L'analisi delle componenti principali (PCA), è una tecnica utilizzata nell'ambito della statistica multivariata che permette di identificare una nuova variabile in grado di spiegare la maggior parte delle variabili associate ai nostri campioni. Nel nostro caso la PCA dimostra che le due componenti principali suddividono i nostri campioni sulla base del tessuto di origine, striato oppure corteccia (Figura 41).

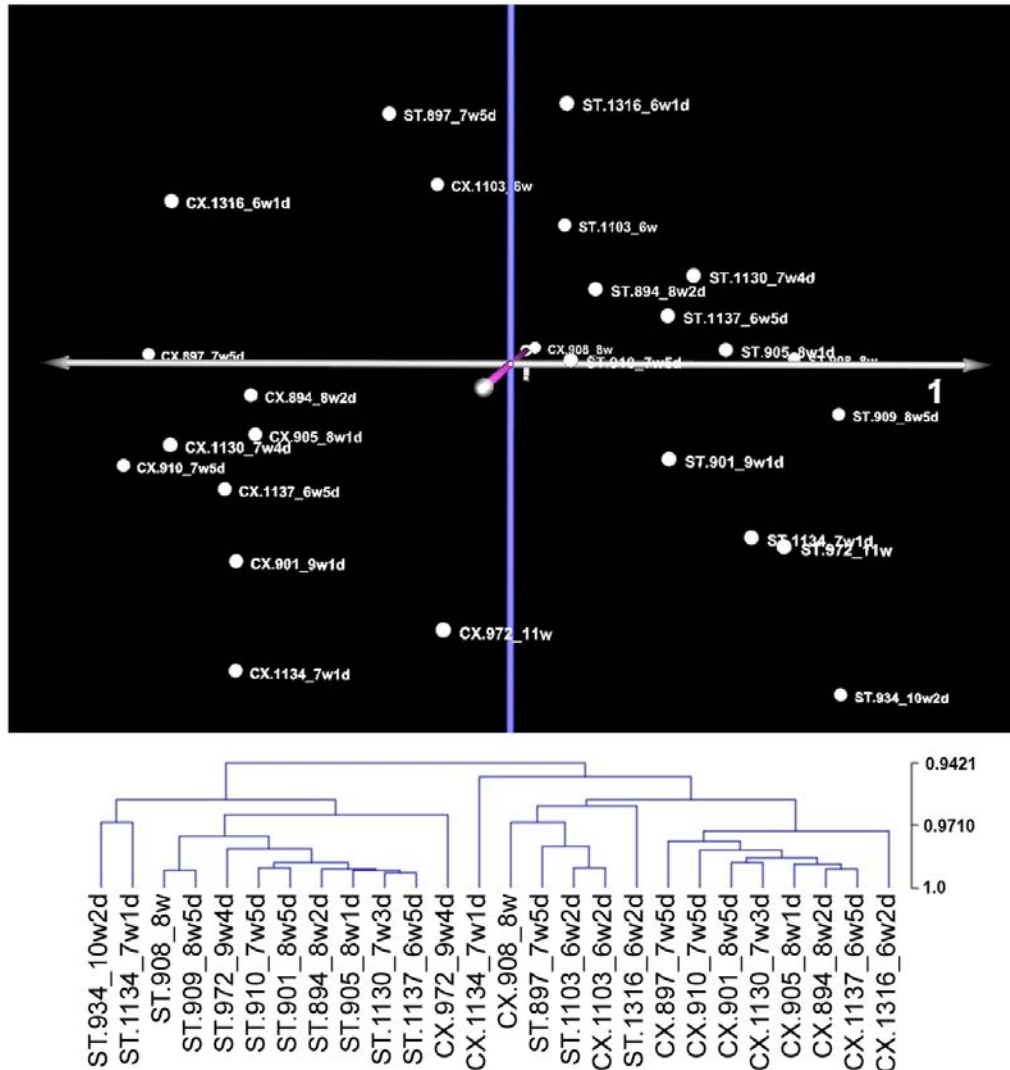


Figura 41. Analisi della componente principale (PCA) dimostra che i campioni sono suddivisi sulla base del tessuto di origine.

L'analisi di *class comparison* su 9 coppie di campioni ha identificato 1306 geni differenzialmente espressi che distinguono le due aree telencefaliche, la cui espressione ha una variazione  $\geq \pm 1.7$ . La rimozione delle 3 coppie di campioni caratterizzate da un'espressione mista ha permesso di aumentare il numero di geni con un'espressione differenziale tra striato e corteccia durante lo sviluppo. In particolare 859 geni sono up-regolati (indicati in verde) e 447 down-regolati (indicati in rosso) in

striato rispetto alla corteccia. L'analisi di *unsupervised hierarchical clustering* mostra che i geni identificati distinguono perfettamente i campioni di striato da quelli di corteccia (Figura 42, Tabella 2). Tra i geni differenzialmente espressi sono stati identificati fattori di trascrizione noti la cui espressione striato- o corteccia-specifica è già stata descritta in letteratura nei roditori.

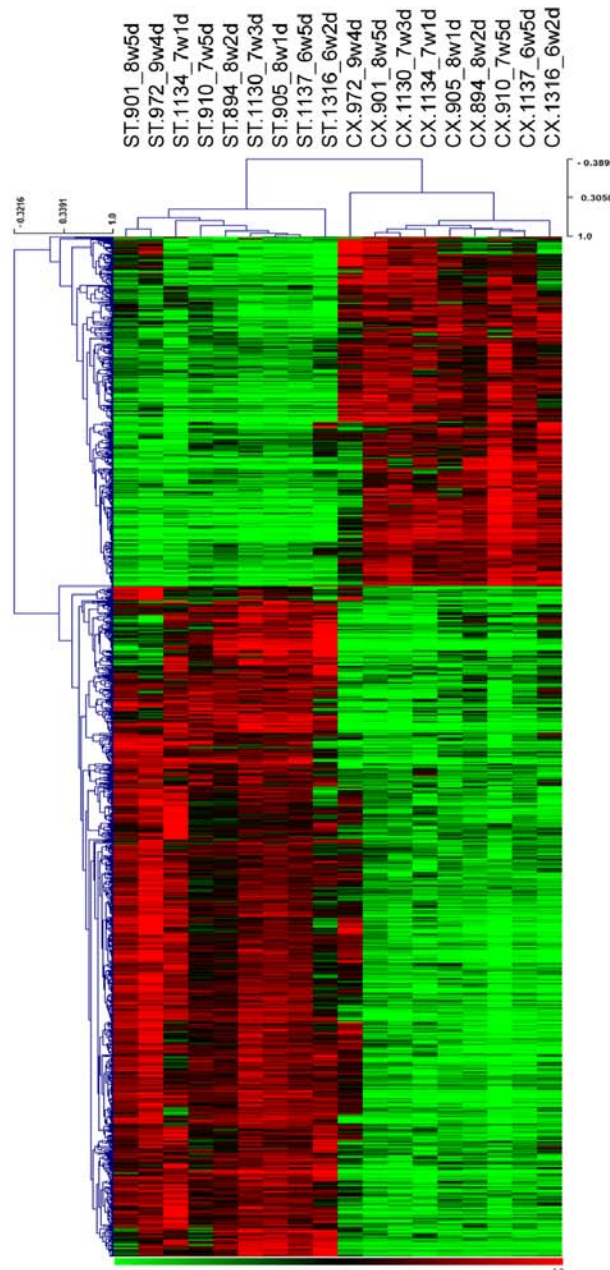


Figura 42. L'analisi di *unsupervised hierarchical clustering* effettuata su 9 coppie di campioni dimostra come i pattern di espressione genica striatale e corticale siano perfettamente distinti l'uno dall'altro. La direzione dell'espressione differenziale è rappresentata da un codice colore: il rosso indica la *up*-regolazione dell'espressione genica mentre il verde la *down*-regolazione in striato e corteccia rispettivamente.

I geni differenzialmente espressi up-regolati in striato comprendono *GSX2*, *ASCL1* e *EBF1*: fattori di trascrizione espressi nei progenitori prima (*GSX2*, *ASCL1*) e nei precursori striatali poi (*ASCL1*, *EBF1*) secondo un pattern temporale specifico (Corbin et al., 2003; Toresson et al., 1999; Casarosa et al., 1999; Yun et al., 2002; Long et al., 2009a; Wang et al., 2009; Garel et al., 1999). Tra i DEG down-regolati in striato (e quindi up-regolati in corteccia) sono stati identificati, ad esempio, *PAX6* e *TBR2* (*EOMES*), fattori di trascrizione espressi nei progenitori e precursori corticali rispettivamente (Mallamaci et al., 1998; Bayatti et al., 2008b; Sessa et al., 2010) (Figura 42, Tabella 2).

PROBE_ID	SYMBOL	Raw p value	avg_ST	avg_CX	FC <sub>(ST)</sub>	P-val*
ILMN_1763390	ISL1	2.47E-05	5378.685778	341.81109	-15.73584338	7.32E-04
ILMN_1778681	EBF1	4.45E-04	1540.664956	243.3011	-6.332338635	4.39E-03
ILMN_1701653	ASCL1	9.43E-07	9378.083444	2376.8394	-3.945610753	1.54E-04
ILMN_1710727	GSX2	1.79E-05	237.7636778	84.392658	-2.81735024	6.03E-04
ILMN_1789905	PAX6	9.25E-04	573.3561667	1725.8523	3.01008768	7.32E-03
ILMN_1760509	EOMES	7.04E-04	951.0488333	2795.0797	2.938944542	5.99E-03

Tabella 2. Esempi di geni differenzialmente espressi. Per ciascun gene è indicato il numero della sonda Illumina che lo identifica (Probe\_ID), la significatività (Raw p value), il valore di espressione in striato e corteccia (avg ST, avg CX), il *fold increase* dell'espressione genica rispetto all'espressione in striato (FC<sub>(ST)</sub>) e la relatività significatività (P-val\*).

Analisi di arricchimento genico e di *Gene Ontology* (GO) hanno rivelato la presenza di classi geniche arricchite associate a “sviluppo del sistema nervoso”, “neurogenesi”, “formazione di strutture anatomiche” e “sviluppo del sistema nervoso centrale” (Figura 43). In aggiunta uno studio dei *pathway* arricchiti ha identificato *pathway* associati a “trasmissione del segnale GABAergico” e “trasmissione del segnale del recettore GABA-B nei terminali pre-sinaptici”; l'arricchimento di queste vie del segnale è in perfetto accordo con il fenotipo GABAergico dei neuroni striatali (Figura 44).



1. Identificazione del corredo trascrizionale che determina l'identità dello striato umano durante la seconda metà del primo trimestre

#	Processes	0	10	20	30	40	50	60	70	-log(pValue)	Ratio
1	nervous system development										374/2396
2	neurogenesis										283/1660
3	generation of neurons										273/1565
4	neuron differentiation										233/1192
5	system development										494/4513
6	cell differentiation										402/3334
7	single-multicellular organism process										635/6809
8	multicellular organismal development										529/5156
9	cellular developmental process										406/3444
10	developmental process										557/5633
11	anatomical structure development										518/5051
12	multicellular organismal process										641/7061
13	cell development										262/1758
14	neuron development										185/1003
15	central nervous system development										182/1017
16	anatomical structure formation involved in morphogenesis										264/1909
17	transmission of nerve impulse										171/926
18	cell-cell signaling										199/1208
19	multicellular organismal signaling										172/949
20	anatomical structure morphogenesis										303/2422
21	single-organism developmental process										450/4422
22	synaptic transmission										154/807
23	cell morphogenesis involved in differentiation										155/822
24	neuron projection development										151/816
25	neuron projection morphogenesis										139/710

Figura 43. Classi geniche arricchite identificate dall'analisi di *Gene Ontology* (GO). La barra arancione indica la significatività statistica. Nella colonna *Ratio* in verde è indicato il numero di geni appartenenti a quella classe genica, in rosso il numero totale di geni che costituisce la classe in esame presente nel database.

1. Identificazione del corredo trascrizionale che determina l'identità dello striato umano durante la seconda metà del primo trimestre

#	Maps	0	1	2	3	4	5	6	-log(pValue)	Ratio
1	Neurophysiological process GABAergic neurotransmission									11/22
2	Neurophysiological process GABA-B receptor signaling in presynaptic nerve terminals									10/22
3	Neurophysiological process Role of CDK5 in presynaptic signaling									9/17
4	Neurophysiological process EphB receptors in dendritic spine morphogenesis and synaptogenesis									10/28
5	Nicotine signaling in GABAergic neurons									7/18
6	Neurophysiological process GABA-B receptor-mediated regulation of glutamate signaling in Purkinje cells									6/13

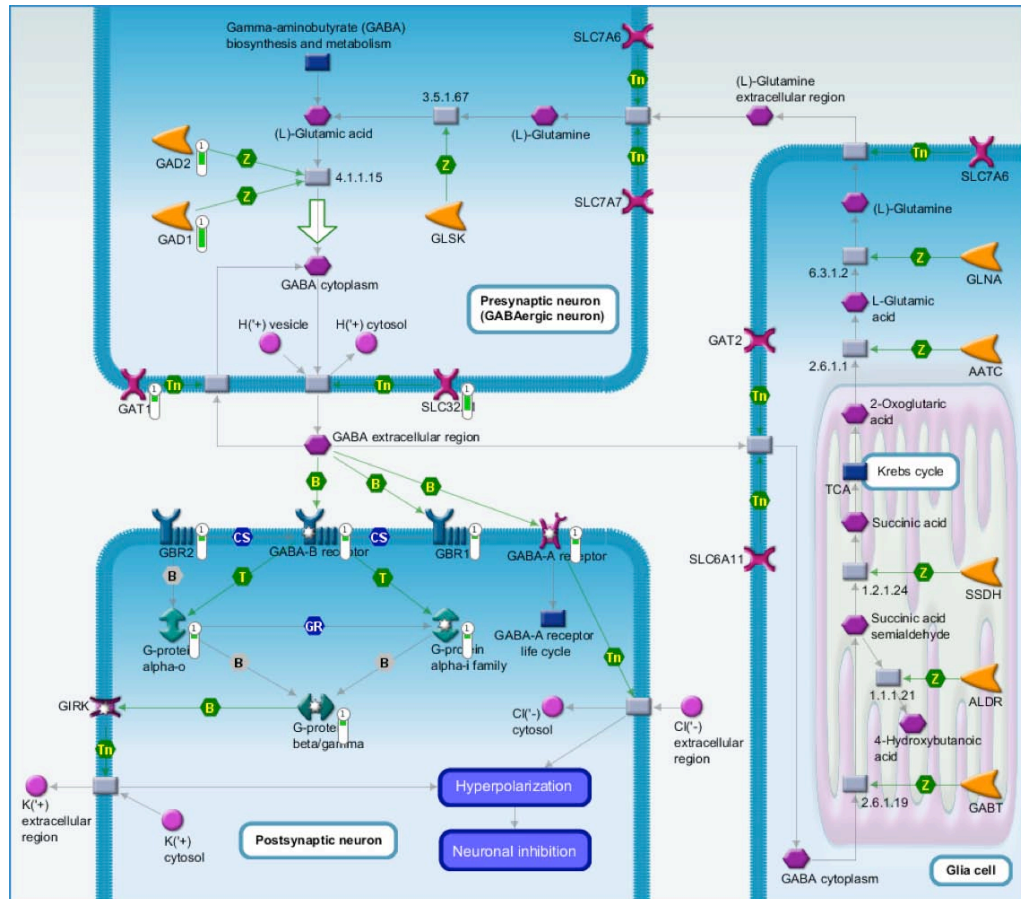


Figura 44. Tabella riassuntiva dei principali *pathway* arricchiti nei DEG (sopra). La barra arancione indica la significatività statistica. Nella colonna *Ratio* in verde è indicato il numero di geni appartenenti a quella classe genica, in rosso il numero totale di geni che costituisce la classe in esame presente nel database. Sotto è rappresentato il *pathway* della trasmissione GABAergica identificata tra le vie del segnale arricchite nei geni differenzialmente espressi arricchiti in striato.

## 1.2 I geni bimodali identificati definiscono il corredo trascrizionale minimo che distingue striato e corteccia durante lo sviluppo fetale umano

Parallelamente all'analisi di *class comparison* descritta nel capitolo precedente, è stato utilizzato un approccio parallelo di *de novo class discovery* mediante il quale i dati trascrizionali sono utilizzati per identificare nuove classi di geni in un sistema privo d'ipotesi di partenza.

L'analisi ha identificato 145 geni bimodali tra le 26629 sonde espresse. Di questi, 92 geni sono associati con la diversa origine del tessuto (striatale o corticale, Chi-squared test  $p < 0.05$ ), 8 geni bimodali sono associati con il sesso dei campioni. L'identificazione di geni associati al sesso costituisce un controllo positivo interno al nostro esperimento che dimostra come la tecnica sia in grado di identificare i geni presenti in dosi diverse perché appartenenti a due classi fenotipiche differenti, in questo caso perché presenti sui cromosomi sessuali.

Tutti i geni bimodali identificati fanno parte dei geni differenzialmente espressi.

Tra i 92 geni bimodali, 51 sono arricchiti in striato (Figura 33) e comprendono geni la cui espressione e funzione durante lo sviluppo e differenziamento striatale è nota come *GAD1*, *GAD2*, *SLC32A1* (un trasportatore vescicolare del GABA), *ISL1*, *DLX1*, *DLX5*, *EBF1*, *TAC1* e *LMO3* (Wang and Liu, 2001) (Long et al., 2009a); (Garel et al., 1999) (Hinks et al., 1997) (Anderson et al., 1997). L'analisi dei geni bimodali ha identificato anche nuovi geni la cui espressione striato-specifica non era mai stata descritta in precedenza (*ZFHX3*) e, inaspettatamente, il fattore di trascrizione *NKX2-1*, che nei roditori, è ampiamente descritto come marcatore di MGE e di interneuroni striatali (Nobrega-Pereira et al., 2010; Sussel et al., 1999). Fino ad ora *NKX2-1* non era mai stato descritto come marcatore di LGE/striato.

41 geni bimodali sono risultati arricchiti in corteccia (Figura 45). Questa lista comprende geni quali *DMRT2*, *EMX1*, *EMX2*, *FEZF2* e *OTX1*, tra questi citiamo *TFAP2C* la cui espressione corteccia-specifica nell'uomo è in accordo con la sua espressione nei progenitori corticali descritta nel topo (Gu et al., 2000).

Il chip Illumina HumanHT-12 v4 possiede delle sonde specifiche per il riconoscimento di RNA non codificanti (ncRNA). L'analisi dei geni bimodali ha identificato un'arricchita espressione genica di diversi RNA non codificanti sia in striato sia in corteccia. In particolar modo il lincRNA *LINC00403* e *DLX6AS* sono stati identificati in striato, mentre *EMX2OS* in corteccia.

Infine l'analisi di arricchimento genico e di *Gene Ontology* (GO) ha rivelato la presenza di classi geniche arricchite associate a “differenziamento telencefalico”, “*commitment* telencefalico”, “*commitment* neuronale” e classi di geni che intervengono nella “regolazione della trascrizione genica DNA-dipendente” e “trascrizione genica DNA-dipendente” (Figura 46).

1. Identificazione del corredo trascrizionale che determina l'identità dello striato umano durante la seconda metà del primo trimestre

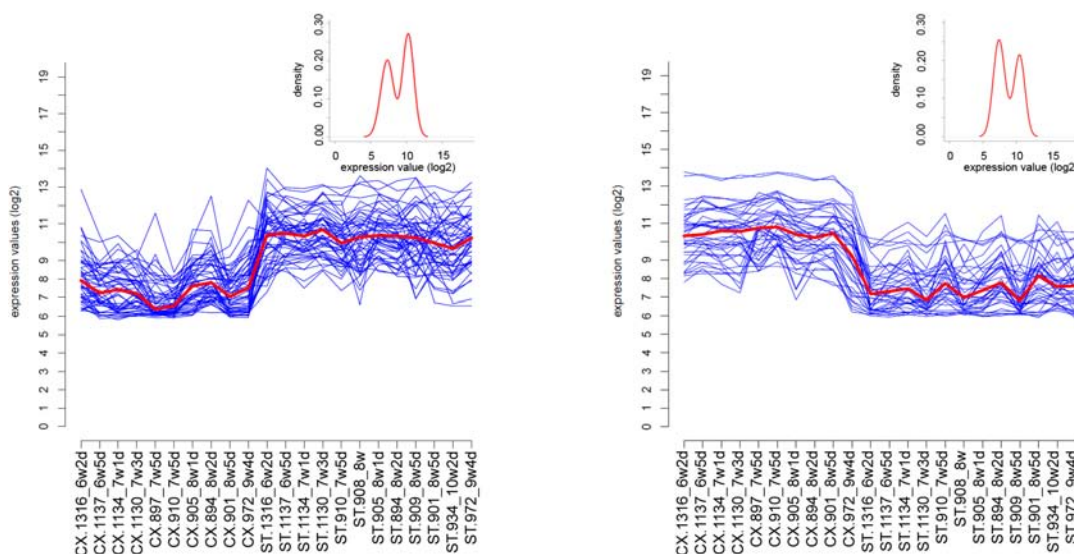


Figura 45. L'analisi dei geni bimodali ha identificato 51 BEG arricchiti in striato (sinistra) e 41 in corteccia (destra). Le linee blu indicano l'espressione di ciascun gene tra i campioni, in rosso è indicata la mediana dell'espressione.

# Processes	0	2	4	6	8	-log(pValue)	Ratio
1 forebrain neuron fate commitment							4/11
2 multicellular organismal development							23/5036
3 forebrain neuron differentiation							5/41
4 negative regulation of transcription from RNA polymerase II promoter							17/739
5 regulation of transcription, DNA-dependent							32/3557
6 dentate gyrus development							5/21
7 palate development							7/90
8 hippocampus development							7/97
9 neuron fate commitment							5/77
10 neuron differentiation							8/1231
11 osteoblast differentiation							6/108
12 BMP signaling pathway							6/84
13 odontogenesis of dentin-containing tooth							6/94
14 sebaceous gland development							3/8
15 hypothalamus development							4/34
16 forebrain anterior/posterior pattern specification							3/8
17 positive regulation of canonical Wnt receptor signaling pathway							5/56
18 somitogenesis							5/77
19 forebrain neuron development							3/21
20 anatomical structure regression							3/16
21 canonical Wnt receptor signaling pathway							6/112
22 Wnt receptor signaling pathway							8/289
23 cerebral cortex neuron differentiation							3/22
24 transcription, DNA-dependent							26/2605
25 skin development							5/81

Figura 46. Classi geniche arricchite identificate dall'analisi di *Gene Ontology* (GO) dei geni bimodali. La barra arancione indica la significatività statistica. Nella colonna *Ratio* in verde è indicato il numero di geni appartenenti a quella classe genica, in rosso il numero totale di geni che costituisce la classe in esame presente nel database.

### 1.3 L'analisi WGCNA identifica moduli di geni co-espressi durante lo sviluppo fetale del telencefalo umano

Tramite l'analisi WGCNA è stata indagata l'organizzazione funzionale del trascrittoma umano durante lo sviluppo embrionale e fetale. Sono stati identificati 15 moduli associati ad altrettanti pattern di co-espressione genica (Figura 35). Tramite un'analisi di correlazione fenotipo/modulo sono stati identificati i possibili attributi associati a ciascun modulo (Figura 47). In particolare, i moduli M2 e M7 mostrano una forte correlazione con il tessuto d'origine (Figura 47), al contrario l'età dei campioni, il batch del chip Illumina impiegato per l'analisi e il sesso non influiscono su questa associazione.

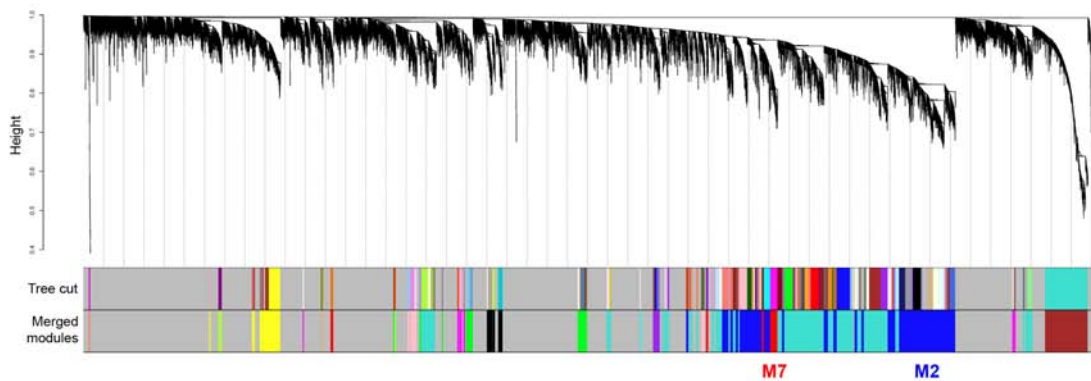


Figura 47. L'analisi WGCNA ha identificato 15 moduli di geni co-espressi nel trascrittoma umano durante lo sviluppo fetale (sopra). Analisi di correlazione tra i moduli e tessuto d'origine, batch, età sesso (sotto).

L'analisi di *gene ontology* ha identificato che classi geniche associate a “formazione del pattern dorso/ventrale” e al “commitment neuronale” sono significativamente arricchite nel modulo M7. In accordo con questi risultati i network relativi a “*signaling* di hedgehog durante lo sviluppo” e il “*signaling* di traduzione del segnale di WNT” sono tra i *pathway* più arricchiti. All'interno del modulo M7 è stata eseguita un'analisi di correlazione tra tutti i geni che costituiscono il modulo ed il tessuto di origine. I geni correlati allo striato sono localizzati nel quadrante Q4, mentre quelli correlati alla corteccia nel quadrante Q2 (Figura 48).

I geni che possiedono il maggior grado di connettività all'interno del modulo, sono definiti *hub genes*. Di particolare rilevanza è che i geni differenzialmente espressi e i geni bimodali sono *hub genes* nel modulo M7 (Figura 35). Tra gli *hub genes* striatali citiamo *NKX2-1* e *PTCH1*, tra quelli corticali *EMX1* e *DACH1* (Figura 48).

Analogamente i geni correlati con lo striato nel modulo M2 sono arricchiti in network e vie del segnale associati con il fenotipo GABAergico e la trasmissione neuronale come “*signaling* del recettore GABA”, “*signaling* dei recettori dopaminergici” e “DARPP-32 feedback nel segnale del c-AMP” (Figura 49). Nell'insieme questi



risultati indicano che, nella finestra di sviluppo analizzata, LGE/striato possiedono una *signature* associata con MSNs maturi. I geni correlati con la corteccia, al contrario, mostrano un profilo associato a progenitori proliferanti come evidenziato dall'analisi di *gene ontology* che mostra un arricchimento di geni associati a “ciclo cellulare”, “replicazione del DNA”, “divisione cellulare”, e “mitosi”.

Infine è stato identificato il modulo M5 che mostra una correlazione significativa con l'età gestazionale dei campioni analizzati. L'analisi di *gene ontology* ha mostrato un arricchimento di geni associati alla maturazione neuronale come “trasmissione sinaptica”, “trasduzione del segnale”, “clustering delle vescicole sinaptiche”, “regolazione positiva dell'assemblaggio delle sinapsi” e “clustering dei recettori del GABA”.

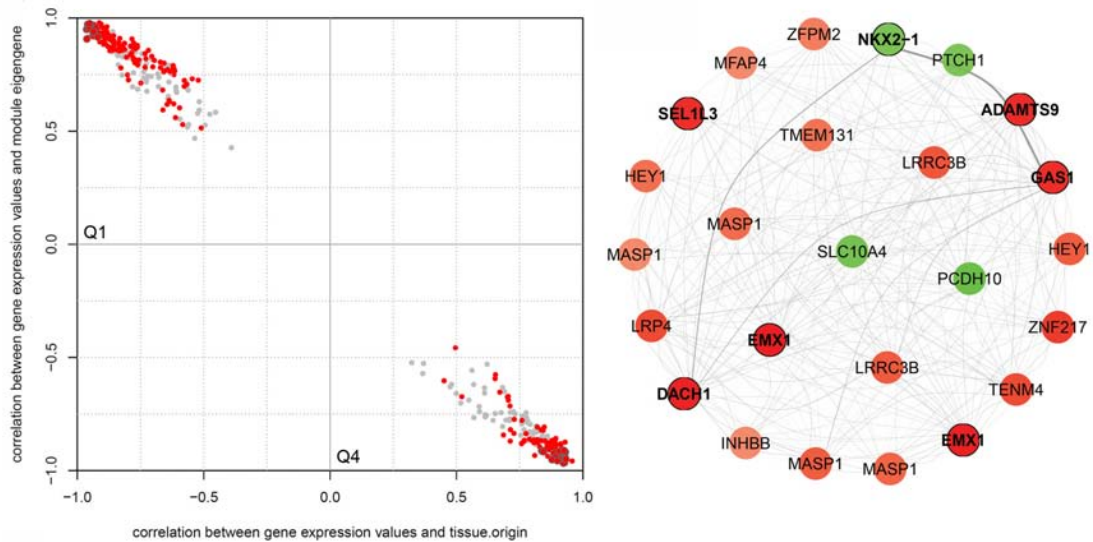


Figura 48. Analisi di correlazione tra il modulo M7 e il tessuto e di origine e *hub genes* del modulo. In rosso i geni ST-correlati, in verde quelli CX-correlati. Il grado di connettività è mostrato come intensità di colore.

1. Identificazione del corredo trascrizionale che determina l'identità dello striato umano durante la seconda metà del primo trimestre

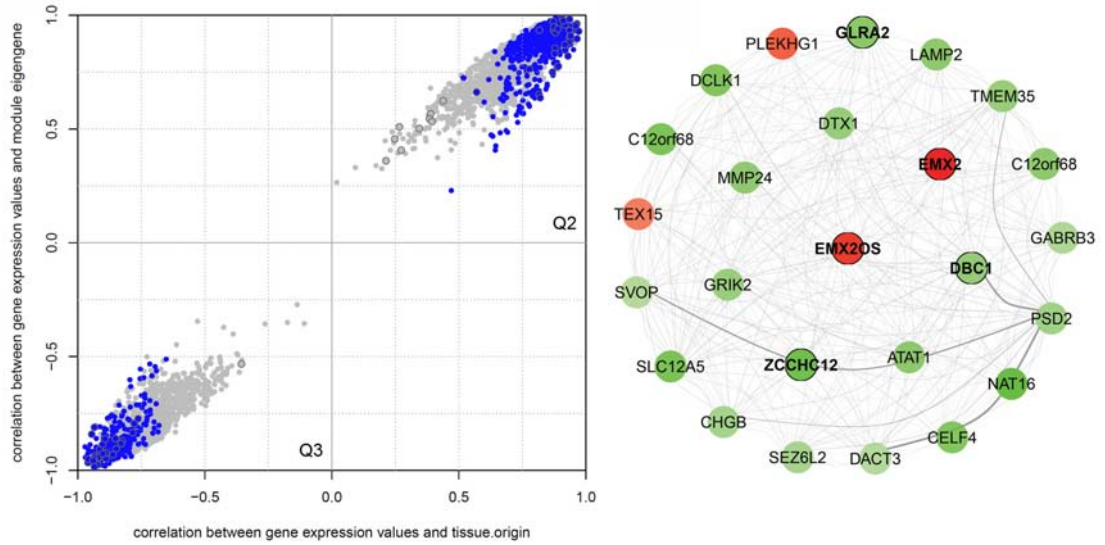


Figura 49. Analisi di correlazione tra il modulo M2 e il tessuto e di origine e *hub genes* del modulo M7. In rosso i geni ST-correlati, in verde quelli CX-correlati. Il grado di connettività è mostrato come intensità di colore.



## **RISULTATI**

### **2. Caratterizzazione spazio-temporale di marcatori telencefalici e striatali durante lo sviluppo embrionale e fetale umano**

## 2.1 Collezione dei campioni di cervello umano fetale a diverse età gestazionali

Grazie alla collaborazione con il laboratorio di Roger Barker presso l'Università di Cambridge e con il Professor Gaetano Bulfamante del Dipartimento di Scienze della Salute dell'Ospedale San Paolo di Milano, abbiamo collezionato tredici cervelli umani fetali con un'età compresa tra 2 settimane e 5 giorni (2w+5d) e 20 settimane di sviluppo (Tabella 3).

Tutti i campioni sono stati utilizzati per le analisi d'immunoistochimica allo scopo di validare i geni differenzialmente espressi ed i geni bimodali e di analizzare temporalmente e spazialmente l'espressione di marcatori chiave implicati nello sviluppo dello striato per definire il set di fattori di trascrizione co-espressi da progenitori neurali, precursori striatali e neuroni stratali.

	Sample ID	Age
1	BRC1129	2w 5d
2	BRC1096	3w 3d
3	BRC1236	3w 4d
4	BRC998	7w
5	BRC1015	7w 2d
6	BRC1050	7w 4d
7	BRC1031	7w 5d
8	BRC1022	7w 6d
9	BRC1232	8w
10	BRC1060	8w 3d
11	BRC832	10w
12	BRC871	11w
13	13AF31	20w

Tabella 3. Elenco dei campioni utilizzati per le analisi d'immunoistochimica.

## 2.2 L'identità spaziale durante la fase di neurulazione e lo sviluppo embrionale precoce è definita da specifici fattori di trascrizione

La neurulazione primaria è il processo attraverso il quale la placca neurale dà origine al tubo neurale, il primordio del sistema nervoso centrale (Stiles and Jernigan, 2010). Nell'uomo a 2w+5d la placca neurale inizia ad invaginarsi (Figura 50) lungo il suo asse centrale originando le pliche neurali. Entro la fine della 3<sup>a</sup> settimana le pliche neurali si avvicinano all'asse centrale dell'embrione e si fondono formando il tubo neurale (Figura 50), il quale si chiude alla fine della 3<sup>a</sup> settimana (Bystron et al., 2008) (Stiles and Jernigan, 2010)

Durante la 4<sup>a</sup> settimana il tubo neurale si organizza lungo l'asse antero-posteriore in vescicole telencefaliche (Bystron et al., 2008) (Stiles and Jernigan, 2010), ciascuna delle quali è definita dall'espressione di precisi fattori di trascrizione regione-specifici.

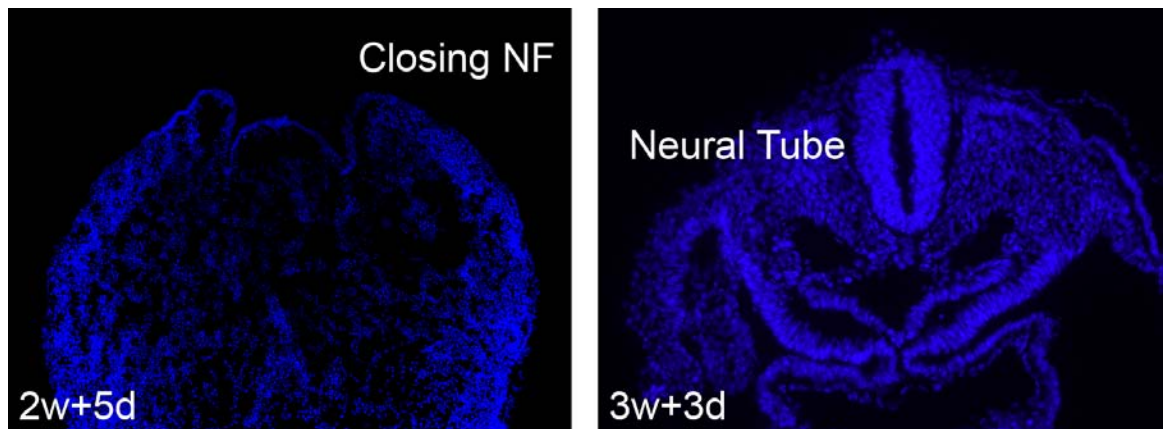


Figura 50. A 2w+5d la piastra neurale s'invagina dando origine alle pliche neurali (NF) che, successivamente, si fondono tra loro andando a costituire il tubo neurale a 3w+3d.

Le analisi bioinformatiche di *class comparison* e di *de novo class discovery* hanno identificato geni la cui espressione permette di distinguere lo striato dalla corteccia durante lo sviluppo fetale. La validazione dei geni differenzialmente espressi e dei geni bimodali è stata effettuata mediante analisi di immunohistochimica allo scopo di effettuare uno studio di espressione genica di fattori di trascrizione striato-specifici a partire dalla fase embrionale dello sviluppo embrionale umano (2-8w). L'analisi di campioni fetali è risultata particolarmente informativa a causa della loro rarità e della loro assenza tra i campioni analizzati mediante bioinformatica.

*Otx2* è un gene materno ed è uno dei geni più precocemente espressi durante lo sviluppo. *Otx2* è espresso nell'intero epiblasto e, in seguito, nella regione più anteriore della gastrula nel topo (Pannese et al., 1995). L'espressione di *Otx2* demarca il compartimento prosencefalico e mesencefalico, la sua espressione, infatti, s'interrompe a livello del prosencefalo (Inoue et al., 2012).

OTX2 è uno dei geni differenzialmente espressi, la cui espressione è risultata arricchita in striato. A 2w+5d, il campione più precoce in nostro possesso, l'espressione di OTX2 è stata osservata nel neuroepitelio N-cadherin<sup>+</sup> delle pliche neurali, sia nella porzione anteriore sia in quella posteriore del tubo neurale in chiusura (Figura 51).

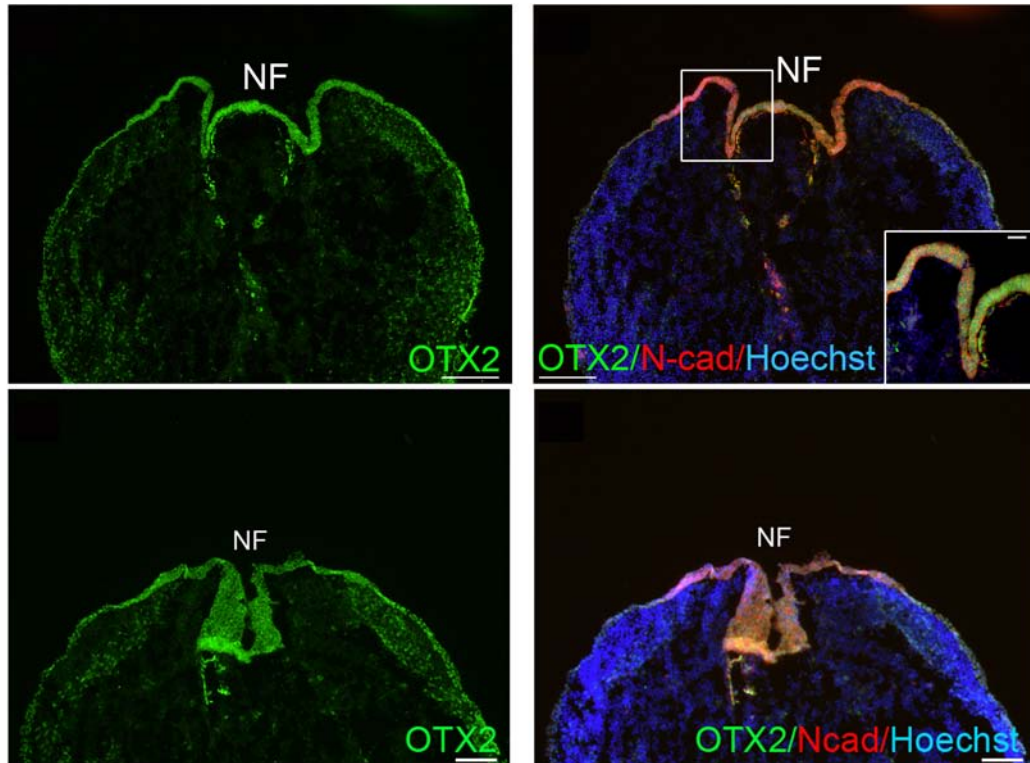


Figura 51. OTX2 nell'embrione umano a 2w+5d è espresso nel neuroectoderma delle pliche neurali in chiusura sia a livello anteriore (A-B) che posteriore (C-D). Abbreviazione: NF, neural fold.

Alla 3<sup>a</sup> settimana di sviluppo le pliche neurale si sono fuse e il tubo neurale si è chiuso (Figura 50); i progenitori neuroepiteliali SOX2<sup>+</sup> che costituiscono il tubo neurale sono organizzati in un epitelio pseudostratificato la cui polarità apico-basale è dimostrata dall'espressione apicale della  $\beta$ -catenina (Figura 52).

La positività per il marcatore PH3 indica un'attiva proliferazione dei progenitori neuroepiteliali (Figura 52).

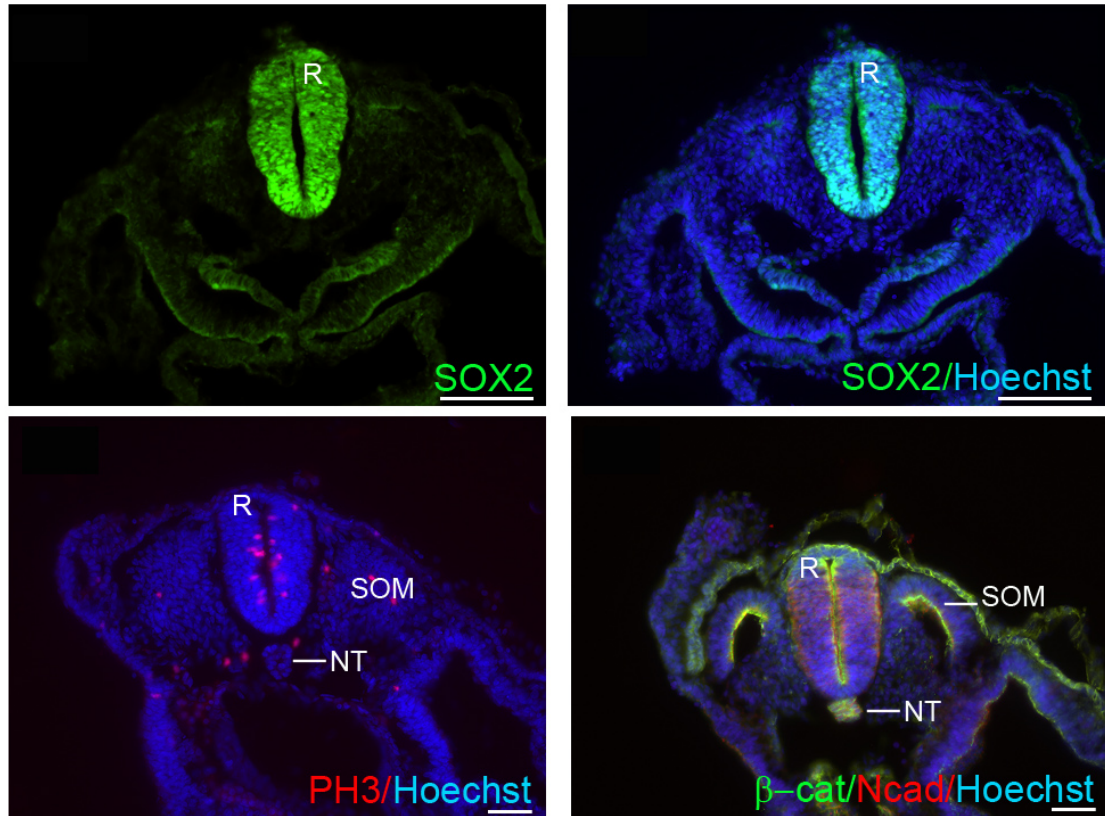


Figura 52. Espressione di SOX2, PH3 e  $\beta$ -catenina nel tubo neurale umano a 3w+3d. Abbreviazioni: SOM, somiti; NT, notocorda.

In seguito alla chiusura delle pliche neurali, il tubo neurale va incontro a una rapida espansione accompagnata dalla formazione delle tre vescicole telencefaliche, come risultato del processo di regionalizzazione antero-posteriore e dorso-ventrale (Stiles and Jernigan, 2010).

A 3w+3d e 3w+4d OTX2 è espresso nel prosencefalo in associazione con nestin e vimentina (Figura 53). A 3w+4d l'espressione di OTX2 interessa anche i preplacodi cefalici.

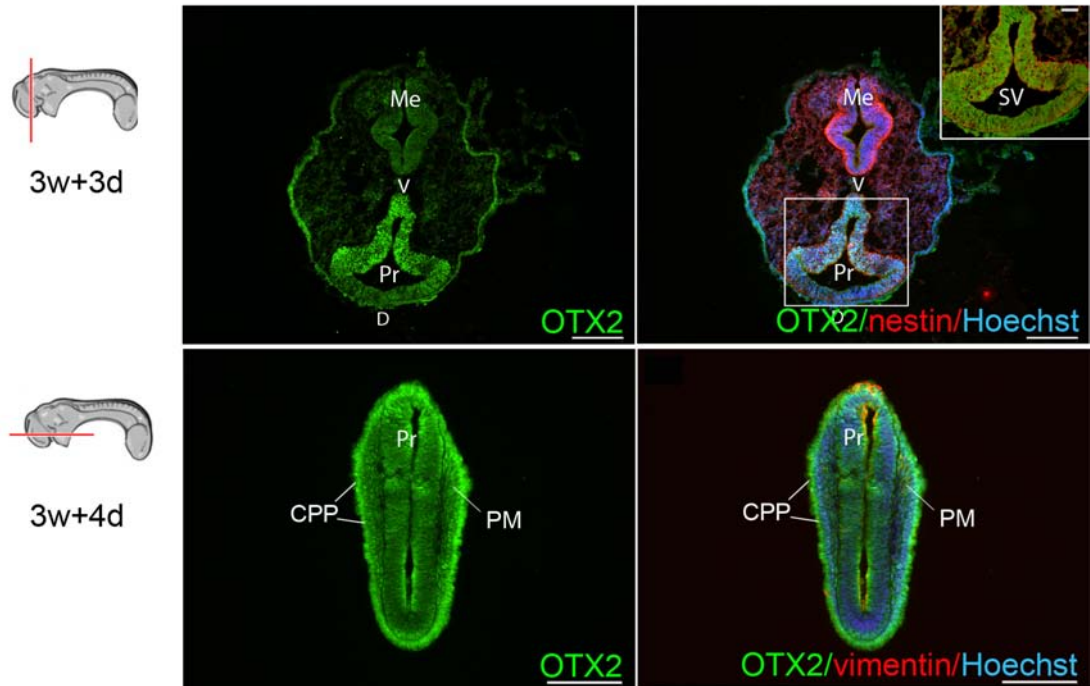


Figura 53. Espressione di OTX2, nestin e vimentin nel tubo neurale a 3w+3d e 3w+4d. Abbreviazioni: Me, mesencefalo; V, ventrale; D, dorsale; Pr, prosencefalo; CPP, preplacode cefalico; PM, mesenchima primordiale.

A 7 settimane il telencefalo ventrale è costituito da una zona ventricolare ed una subventricolare caratterizzate da uno spessore elevato, e da una zona del mantello nella quale hanno già iniziato a migrare i primi neuroni striatali post-mitotici.

La corteccia, al contrario, è costituita dalla zona ventricolare e dalla *cortical plate*. Tra queste due strutture iniziano a formarsi la zona subventricolare e quella intermedia (IZ). A 7 settimane l'espressione di OTX2 interessa la zona ventricolare del telencefalo ventrale e dorsale, senza apparente differenza nei livelli di espressione tra le due regioni telencefaliche (Figura 54). A livello corticale OTX2 è espresso anche nei neuroni migrati nella CP (Figura 54).

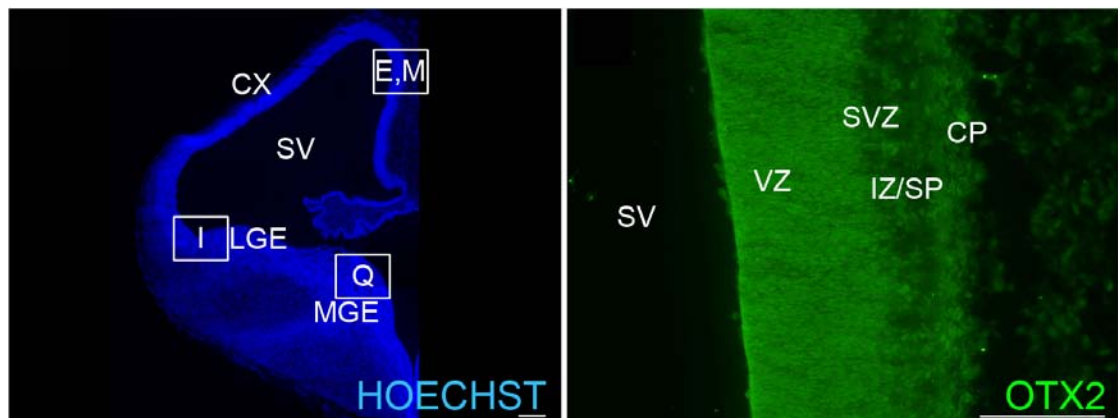


Figura 54. Profilo di espressione di OTX2 nell'embrione umano di 7 settimane.



PAX6 è il marcatore di neuroectoderma più precoce a essere espresso nel sistema nervoso centrale umano durante lo sviluppo (Zhang et al., 2010). In seguito è considerato un marcatore di telencefalo dorsale espresso nei progenitori corticali della zona ventricolare della corteccia in sviluppo (Mallamaci et al., 1998). Questo profilo di espressione è in accordo con l'identificazione di *PAX6* tra i geni differenzialmente espressi arricchiti in corteccia.

Come già descritto per OTX2, a 2w+5d anche PAX6 è espresso nel neuroectoderma delle pliche neurali (Figura 55). In seguito alla chiusura del tubo neurale, a 3w+3d e 3w+4d l'espressione di PAX6 è ristretta ai progenitori neuroepiteliali N-cadherin<sup>+</sup> e nestin<sup>+</sup> della porzione dorsale del prosencefalo (Figura 55). Allo stesso stadio di sviluppo PAX6 è espresso anche nei preplacodi cefalici e nel placode delle lenti (Figura 55). A 7 settimane l'espressione dorsale di PAX6 è mantenuta, come dimostrato dalla totale assenza della sua espressione nel telencefalo ventrale caratterizzato, contrariamente, dall'espressione di GSX2, un noto marcatore di LGE nei roditori (Pei et al., 2011; Toresson et al., 1999; Yun et al., 2003) ed identificato tra i geni differenzialmente espressi arricchiti in striato. L'espressione complementare di PAX6 e GSX2 definisce da un punto di vista molecolare il confine pallio-subpallio (PSB) (Figura 55).

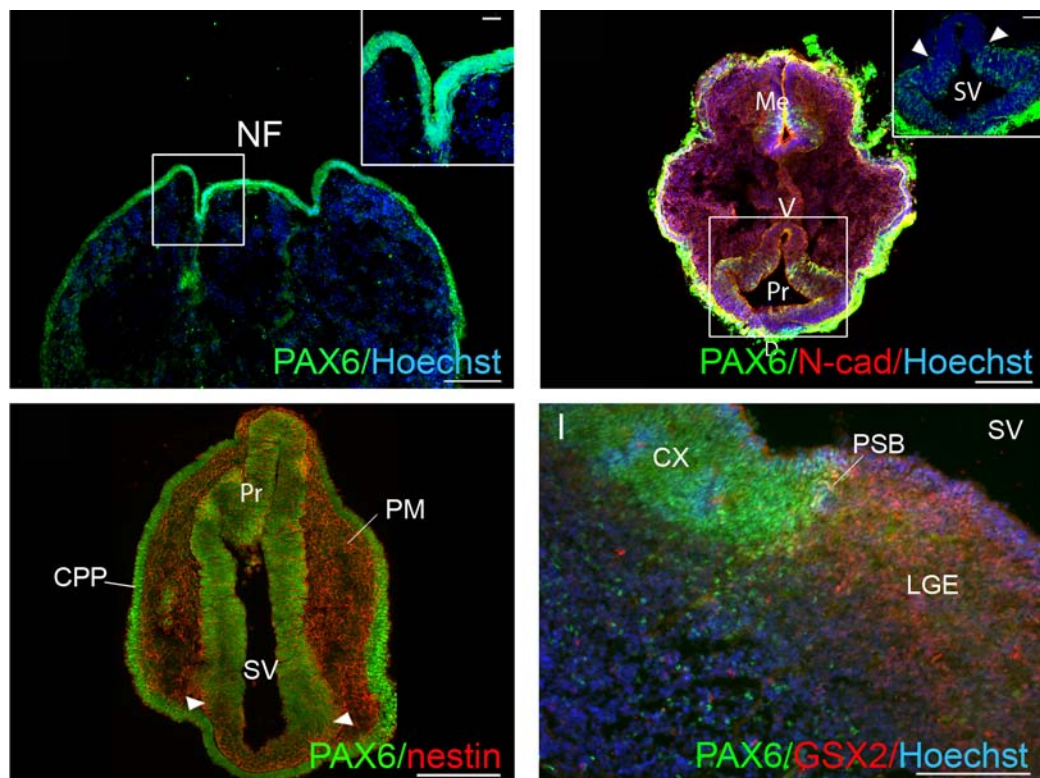


Figura 55. Profilo di espressione di PAX6 durante lo sviluppo fetale umano. Abbreviazioni NF, pliche neurali, SV, supraventricolo, CPP, preplacodi cefalici, PM, mesenchima primordiale.

Nei roditori l'espressione di FOXG1 definisce il telencefalo (Dou et al., 2000) (Martynoga et al., 2005). L'espressione di Foxg1 è indotta dall'azione anteriorizzante di FGF8 (Hebert and Fishell, 2008).

Nell'uomo, FOXG1 inizia a essere espresso a 3w+3d a livello dei progenitori neuroepiteliali del telencefalo (Figura 58). A tempi più precoci l'espressione di FOXG1 non è stata osservata (Figura 58). A 7 settimane l'espressione di FOXG1 interessa l'intera zona ventricolare del telencefalo dorsale e ventrale (Figura 58).

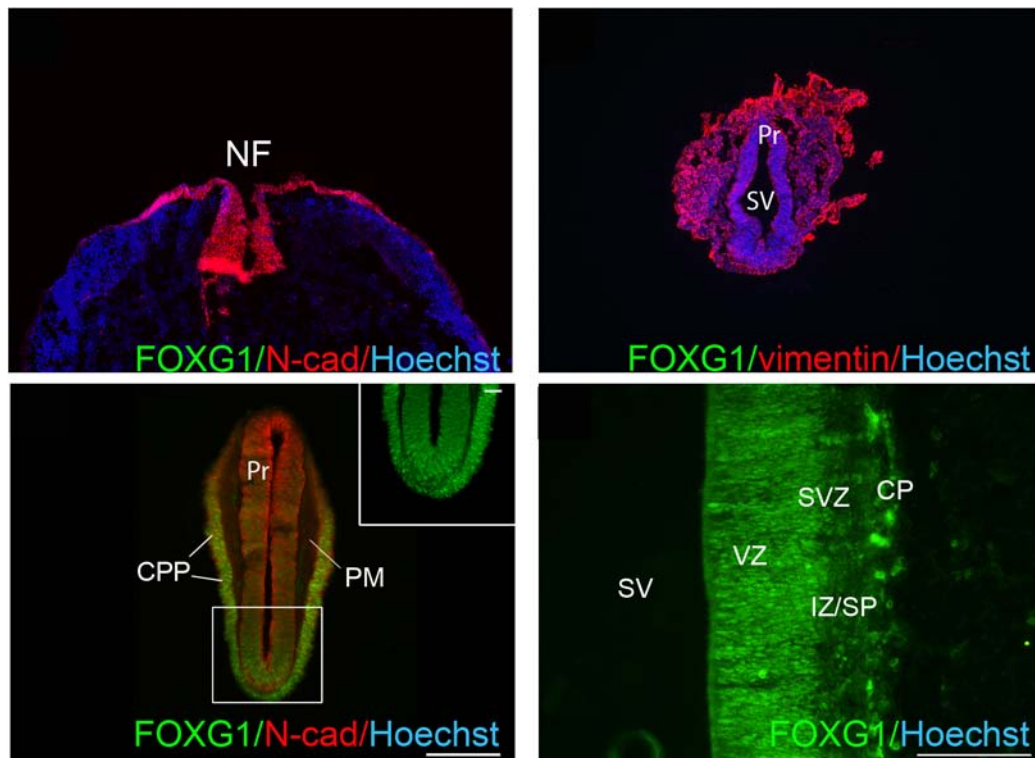


Figura 58. Profilo di espressione di FOXG1 durante lo sviluppo embrionale umano.

La regionalizzazione antero-posteriore e dorso-ventrale procedono parallelamente durante lo sviluppo fetale.

NKX2-1 è un fattore di trascrizione chiave coinvolto nella ventralizzazione dell'intero tubo neurale prima ancora dell'espressione di GSX2 (Corbin et al., 2003). NKX2-1 è stato identificato tra i geni differenzialmente espressi e bimodali arricchiti in striato. Sulla base di questi risultati la sua espressione è stata studiata in tutti i campioni a nostra disposizione. A 2w+5d NKX2-1 è espresso nel neuroepitelio delle pliche neurali in chiusura, con un profilo di espressione analogo a quello descritto per OTX2 e PAX6 (Figura 57). In seguito alla chiusura del tubo neurale, durante la 3<sup>a</sup> settimana di gestazione, l'espressione di NKX2-1 è ristretta esclusivamente al telencefalo e diencefalo ventrali (Figura 57), presentando un *pattern* di espressione complementare a quello di PAX6. Durante lo stesso periodo di sviluppo l'espressione della proteina GSX2 non è riscontrata. A 7 settimane NKX2-1 è espresso nelle zone ventricolari e subventricolari della MGE (Figura 57), mantenendo un'espressione ventrale.

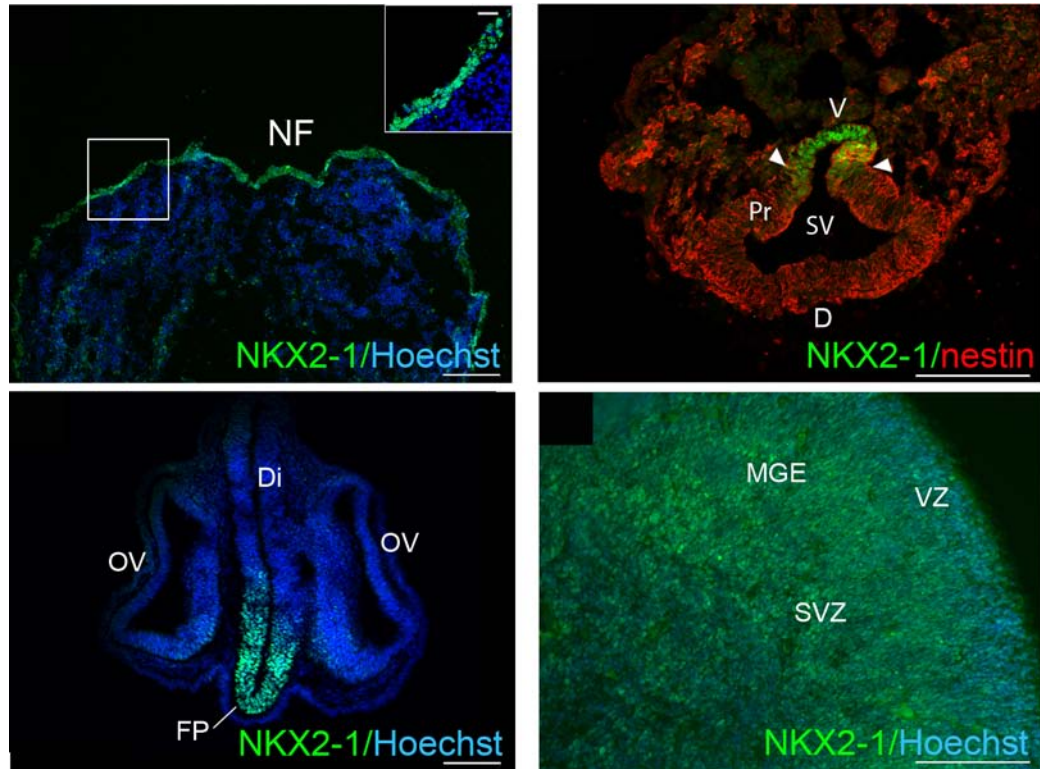


Figura 57. Profilo di espressione di NKX2-1 durante lo sviluppo embrionale umano.

### 2.3 Fattori di trascrizione regione-specifici determinano il confine molecolare tra pallio e subpallio

I confini morfologici e i domini di espressione genica nel telencefalo fetale non sempre si sovrappongono. Nei roditori, ad esempio, il confine tra pallio e subpallio non corrisponde all'angolo tra la corteccia e la LGE ma è spostato ventralmente nella porzione più dorsale della LGE (dLGE) (Campbell, 2003). Questo spostamento è evidente anche nell'uomo. A 8w l'espressione dorsale di PAX6 si spinge ventralmente a livello della dLGE, dove ha inizio l'espressione di ASCL1 (Casarosa et al., 1999; Yun et al., 2002; Long et al., 2009°; Wang et al., 2009) (Figura 58). In accordo con il suo profilo di espressione genica (*ASCL1* mRNA è compreso tra i geni differenzialmente espressi arricchiti in striato), ASCL1 è espresso dai progenitori striatali localizzati nella zona ventricolare e subventricolare del telencefalo ventrale. La sua espressione s'interrompe completamente a livello del PSB dove inizia l'espressione di PAX6 (Figura 58). Il confine molecolare tra pallio e subpallio è definito anche dall'espressione di altri fattori di trascrizione quali TBR2, espresso specificamente nei precursori corticali nella zona subventricolare della corteccia (Sessa et al., 2008; Sessa et al., 2010; Bayatti et al., 2008a), SP8, un marcatore di precursori di interneuroni del bulbo olfattorio (Waclaw et al., 2006; Yun et al., 2003) e GSX2 (Figura 58). In particolare, SP8 marca la dLGE, come descritto nei roditori (Waclaw et al., 2006; Yun et al., 2003) dove SP8 e PAX6 sono co-espressi. Studi di co-localizzazione dimostrano la presenza, a livello del PSB, di un numero esiguo di cellule doppiamente positive per ASCL1/PAX6 o GSX2/PAX6, al contrario, non sono state identificate cellule TBR2<sup>+</sup>/ASCL1<sup>+</sup> (Figura 58).



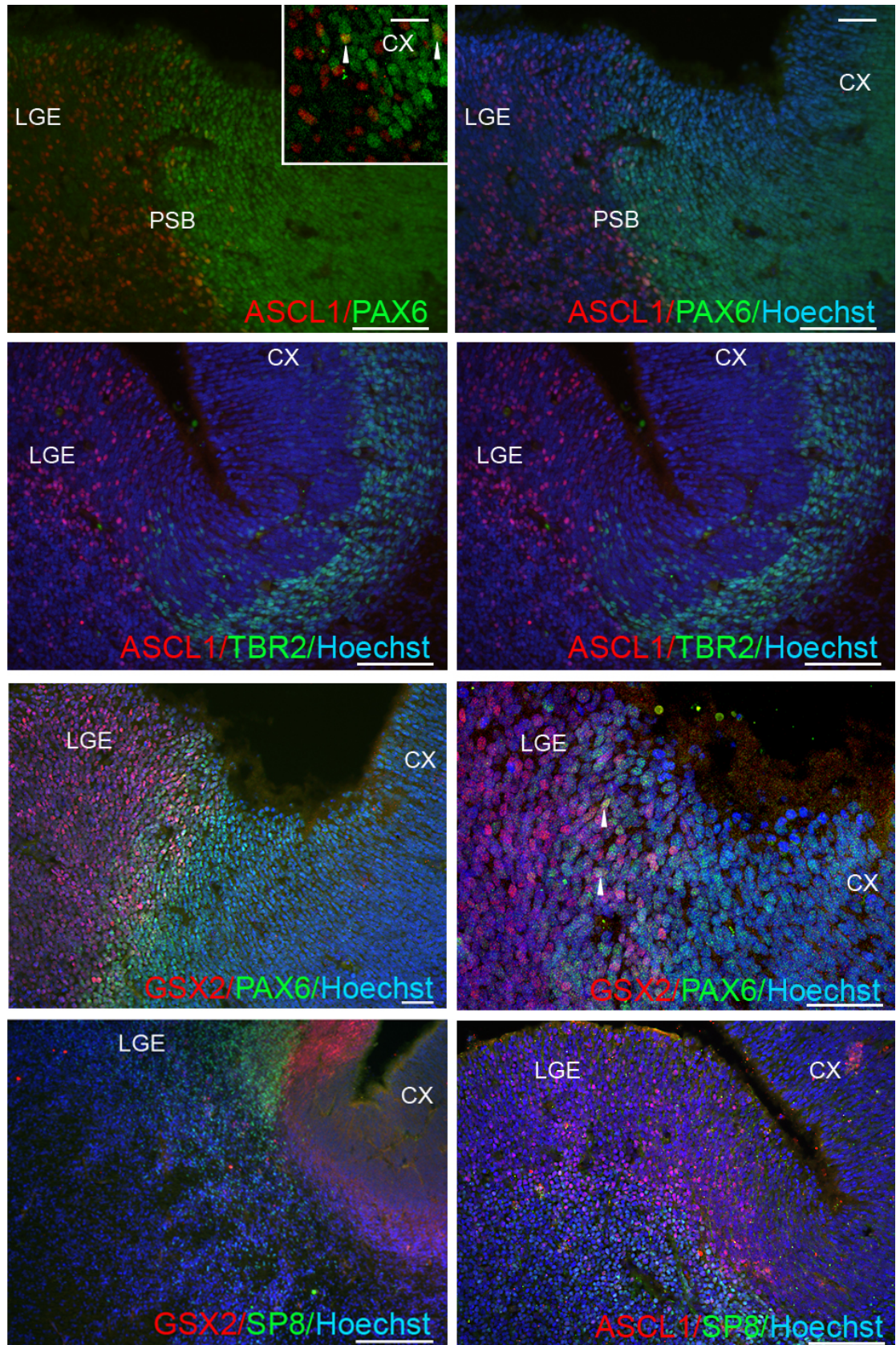


Figura 58. Definizione del confine tra pallio e subpallio attraverso l'espressione di ventrale di ASCL1, GSX2, SP8, e quella dorsale di PAX6, TBR2 a 8 settimane di sviluppo.



### 2.3 La combinazione di fattori di trascrizione discrimina i diversi compartimenti striatali e permette di seguire *in vivo* il differenziamento e la maturazione dello striato durante lo sviluppo fetale umano

Lo striato, come anche la corteccia, è organizzato in diversi domini nei quali sono localizzati specifici tipi cellulari caratterizzati da un diverso grado di differenziamento e maturazione. VZ e SVZ sono costituite rispettivamente da progenitori e precursori striatali in attiva proliferazione, come dimostrato dalla positività per il marcatore Ki67 (Figura 59); al contrario, la zona del mantello è positiva per il marcatore di neuroni post-mitotici MAP2 (Figura 59).

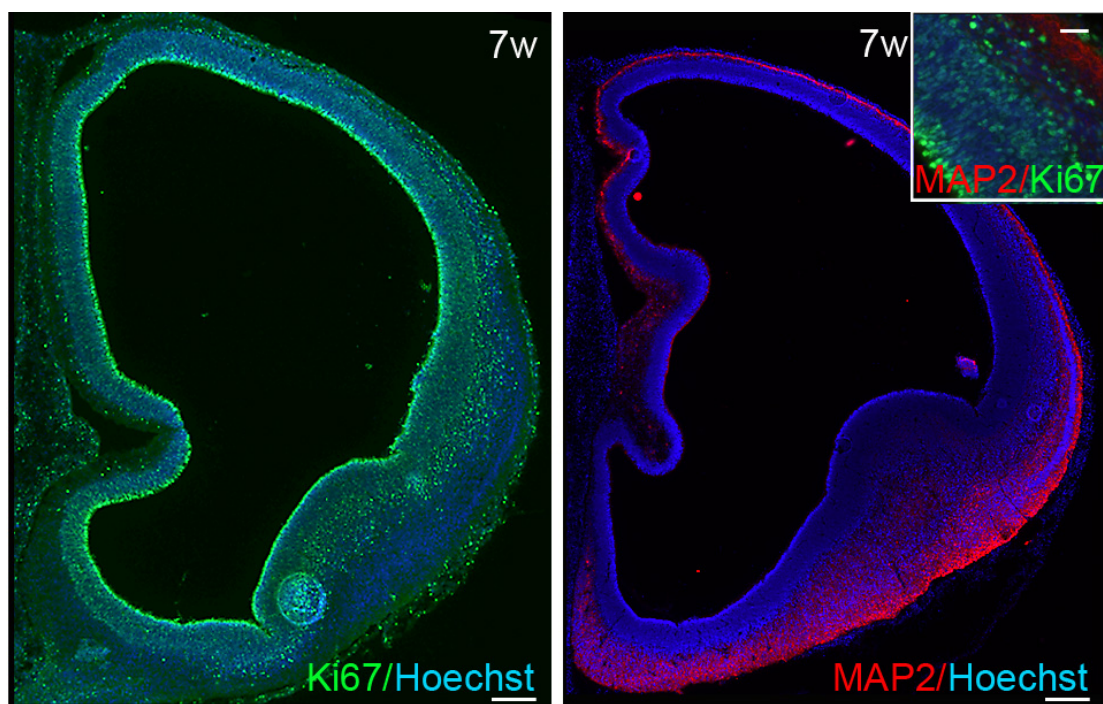


Figura 59. Localizzazione dei progenitori e precursori proliferanti Ki67<sup>+</sup> e dei neuroni post-mitotici MAP2<sup>+</sup> nel telencefalo a 7 settimane di sviluppo.

Ciascuno di questi compartimenti è caratterizzato dall'espressione di specifici fattori di trascrizione che identificano precisi tipi cellulari.

Mentre GSX2 è espresso dai progenitori ventrali proliferanti esclusivamente nella VZ in associazione ai marcatori telencefalici FOXG1 e OTX2, ASCL1 è presente nella zona ventricolare e subventricolare e in alcune cellule nella porzione più dorsale del mantello (Figura 60). L'accumulo di ASCL1 al confine tra zona ventricolare e subventricolare, in associazione con l'espressione VZ-specifica di GSX2 permette di distinguere i due domini ventrali (Figura 60). L'analisi della capacità proliferativa dei progenitori e precursori ASCL1<sup>+</sup> ha evidenziato l'esistenza di due diverse popolazioni neurali: progenitori ASCL1<sup>+</sup>/Ki67<sup>+</sup> principalmente localizzati nella zona ventricolare,



e i precursori striatali  $ASCL1^+/Ki67^-$  localizzati anche nella zona subventricolare (Figura 60).

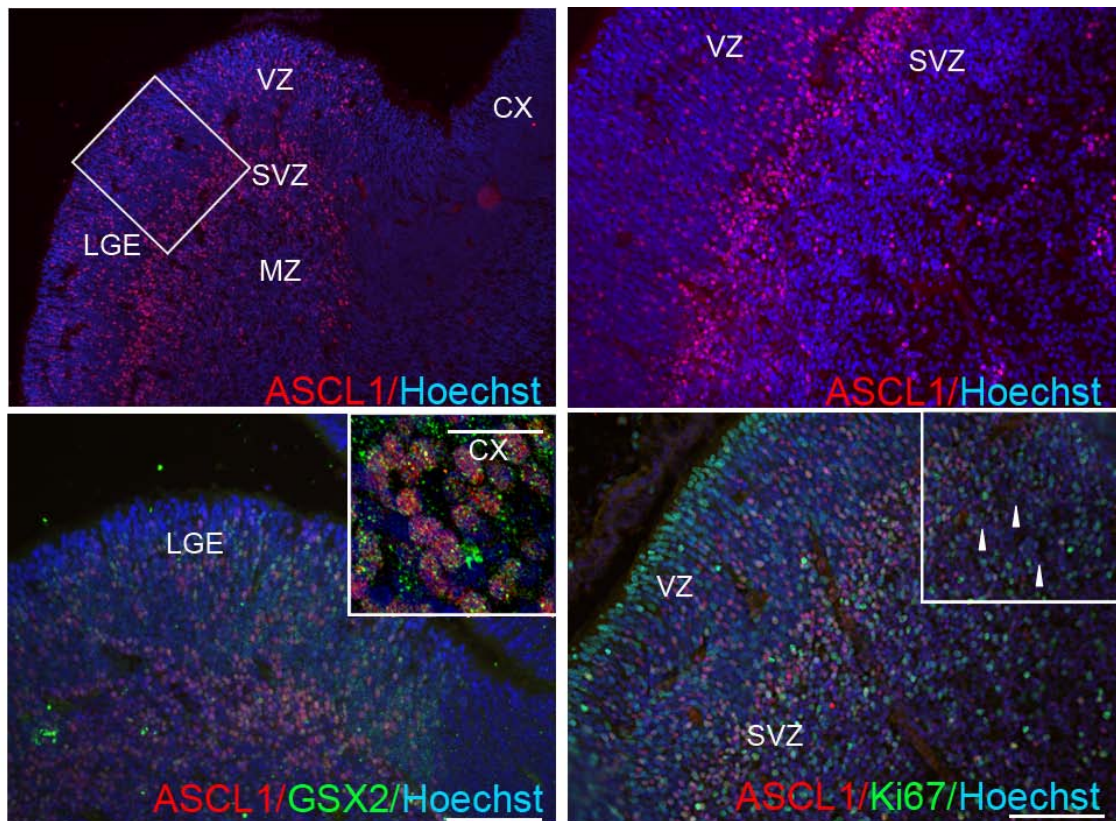


Figura 60. L'espressione di GSX2 e ASCL1 definisce la zona ventricolare e subventricolare del telencefalo umano a 8 settimane.

Nel topo *Isl1* è caratterizzato da un profilo di espressione estremamente dinamico durante lo sviluppo striatale. In particolare *Isl1* è inizialmente espresso in tutti i precursori striatali, per poi essere down-regolato nei neuroni striatali e rimanere espresso esclusivamente negli interneuroni provenienti dalla MGE (Wang et al., 2001). Nell'uomo *ISL1* è stato identificato dall'analisi di *class comparison* e di *class discovery* quale gene striatale discriminante. *In vivo* *ISL1* è espresso nei precursori striatali della zona subventricolare e dai neuroni del mantello (Figura 61). L'espressione di *ISL1* esclusivamente in cellule  $Ki67^-$  dimostra che la sua espressione è successiva all'uscita dal ciclo cellulare (Figura 61).

EBF1, un fattore di trascrizione fondamentale per la migrazione dei progenitori striatali dalla zona subventricolare al mantello (Garel et al., 1999), è compreso nella lista di geni differenzialmente espressi arricchiti in striato. Il profilo di espressione di EBF1 è sovrapponibile a quello di *ISL1*, con cellule positive sia nella zona subventricolare sia nel mantello (figura 61).

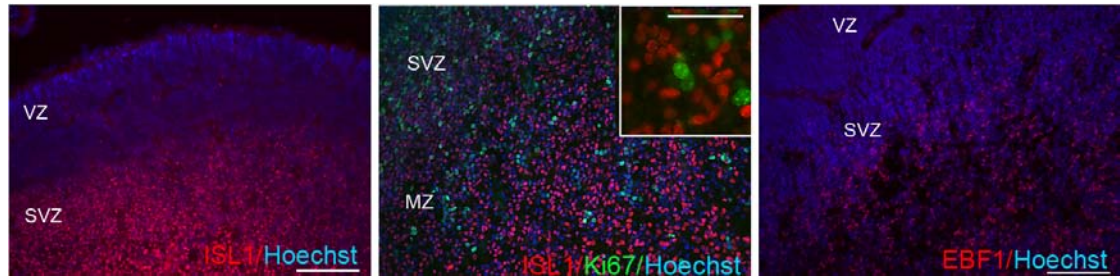


Figura 61. L'espressione di ISL1 e EBF1 definiscono la zona subventricolare del telencefalo umano a 8 settimane.

I progenitori striatali ISL1<sup>+</sup> ed EBF1<sup>+</sup> usciti dal ciclo cellulare migrano dalla zona subventricolare al mantello dove vanno incontro al differenziamento terminale verso MSNs (Stiles and Jernigan, 2010). Nel mantello il passaggio da precursore a neurone striatale è evidenziato dalla co-espressione, nei neuroni post-mitotici, di ISL1 con altri fattori di trascrizione, assenti nella zona subventricolare, come FOXP1, FOXP2 e CTIP2 (Figura 62). Il mantello è inoltre caratterizzato dall'espressione di IKZ1, un fattore di trascrizione che nei roditori è espresso in una sottopopolazione di MSNs (Martin-Ibanez et al., 2010). L'espressione compartimento-specifica è dimostrata anche dall'espressione mutualmente esclusiva di GSX2 e CTIP2 oppure di ASCL1 e FOXP2 (Figura 62).

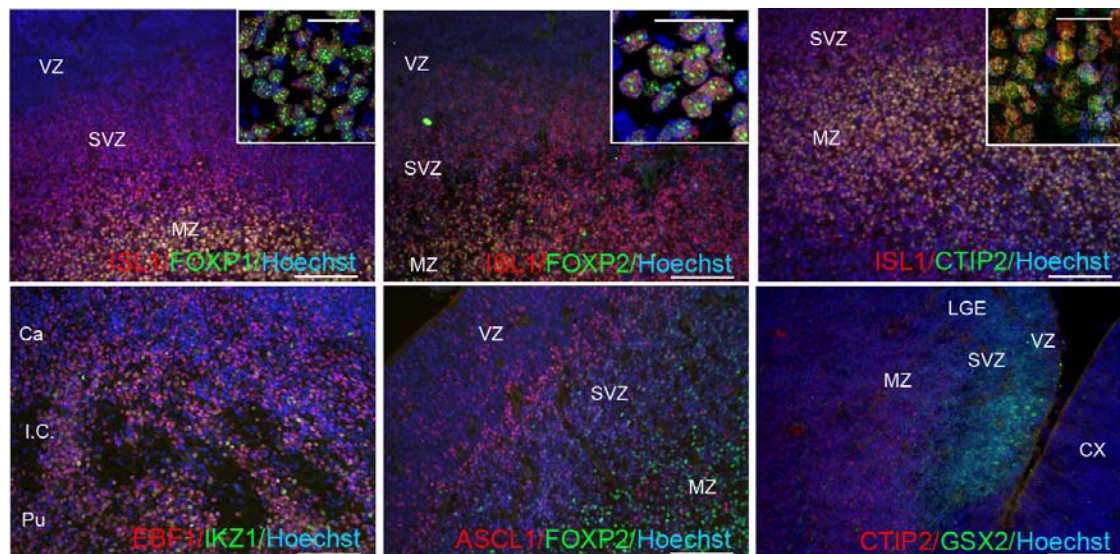


Figura 62. L'espressione di ISL1, EBF1, FOXP1, FOXP2, IKZ1 e CTIP2 definiscono il mantello del telencefalo umano a 8 settimane.

NKX2-1 è uno dei fattori di trascrizione compresi tra i geni differenzialmente espressi e bimodali arricchiti in striato con un'espressione differenziale tra striato e corteccia tra le più elevate. Nei roditori NKX2-1 è universalmente conosciuto quale marcatore di MGE e d'interneuroni GABAergici striatali e corticali (Fertuzinhos et al., 2009). Questo *pattern* di espressione è conservato anche nell'uomo dove, a 8w, osserviamo



una forte espressione di NKX2-1 nell'intera MGE, sia nelle zone di attiva proliferazione (VZ e SVZ) sia nella zona del mantello dove sono localizzati i neuroni post-mitotici. Sorprendentemente i dati trascrizionali sono confermati dall'analisi d'immunofluorescenza a 8 settimane che mostra una vasta espressione di NKX2-1 nel mantello della LGE in associazione con ISL1 e CTIP2 (Figura 63). L'espressione di NKX2-1 nella LGE è, comunque, inferiore rispetto all'espressione in MGE (Figura 73).

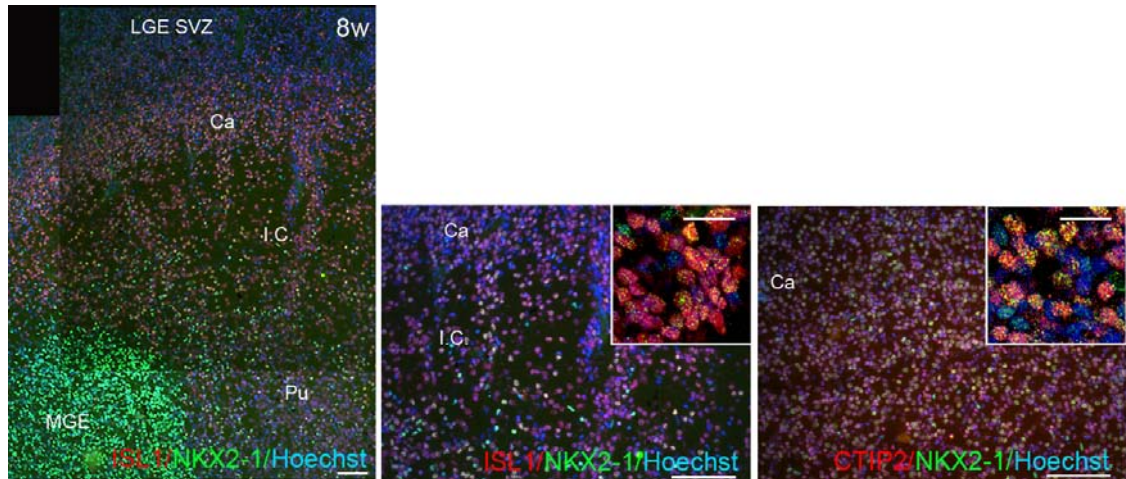


Figura 63. A 8 settimane NKX2-1 è ampiamente espresso nella MGE, nel mantello della LGE NKX2-1 è co-espresso con CTIP2 e ISL1.

I neuroni spinosi medi costituiscono il 90% dei neuroni striatali e sono principalmente identificati dalla co-espressione di CTIP2 e DARPP-32 (Waclaw et al., 2006; Yun et al., 2003). Nell'uomo DARPP-32 inizia a essere espresso in un numero molto ristretto di neuroni nel mantello della LGE a partire da 7 settimane.

A 8 settimane si verifica un incremento della co-espressione di CTIP2 e DARPP-32 (Figura 64).

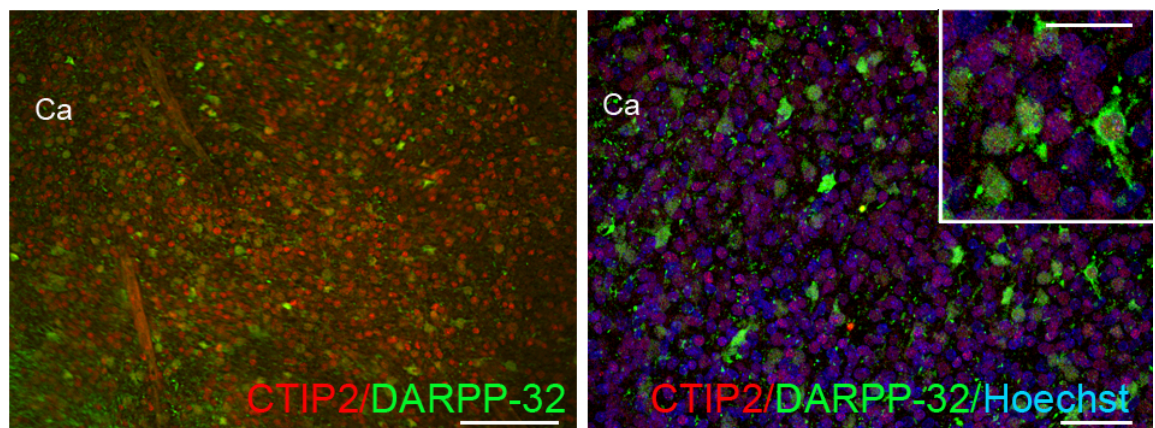


Figura 64. Profilo di espressione di CTIP2 e DARPP-32 nei neuroni striatali spinosi medi a 8 settimane di sviluppo.

Nonostante l'elevata espressione di CTIP2 e DARPP-32 in striato, nessuno dei due geni è stato identificato tra le sonde differenzialmente espresse tra i due tessuti.

I risultati delle analisi di bioinformatica sono supportati dall'analisi d'immunofluorescenza che mostrano l'espressione di CTIP2 e DARPP-32 anche in corteccia (Figura 65). In particolare CTIP2 è espresso nei neuroni post-mitotici migrati nella *cortical plate* sia nel topo (Arlotta et al., 2005; Bystron et al., 2008; Leid et al., 2004), sia nell'uomo (Ip et al., 2010; Ip et al., 2011; Saito et al., 2011), in associazione con il marcatore di neuroni corticali precoci TBR1 (Hevner et al., 2001; Bedogni et al., 2010) (Figura 65).

Nei roditori DARPP-32 è espresso nello strato VI della corteccia (Hisaoka et al., 2010; Rajput et al., 2009). Analisi di doppia immunofluorescenza hanno evidenziato, per la prima volta, la co-espressione di CTIP2 e DARPP-32 nella *cortical plate* umana a 8w (Figura 65).

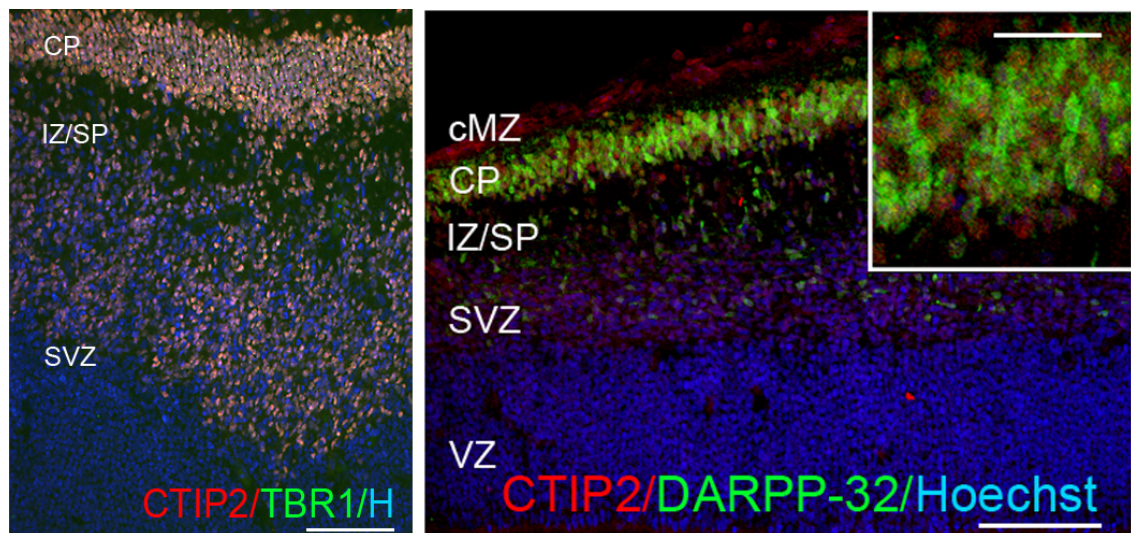


Figura 65. Profilo di espressione di CTIP2, TBR1 e DARPP-32 nei neuroni della *cortical plate* a 8 settimane di sviluppo.

L'estesa analisi di co-espressione di diversi fattori di trascrizione LGE/striato-specifici ha permesso di tracciare il *pattern* di espressione di ciascun compartimento del telencefalo ventrale: zona ventricolare, subventricolare e mantello (Figura 66).

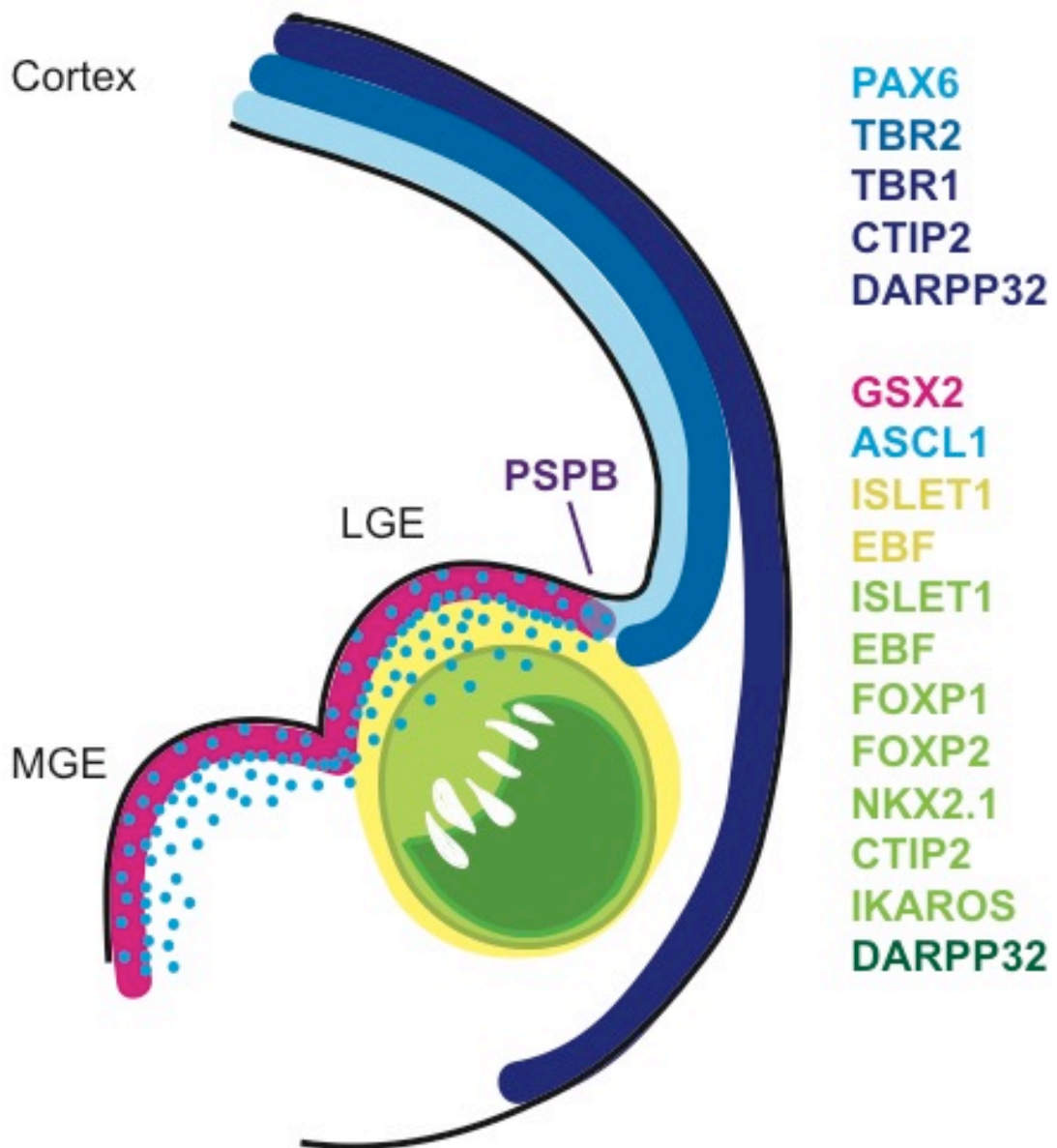


Figura 66. Schema riassuntivo dei fattori di trascrizione espressi nel telencefalo a 8 settimane.

Con il procedere dello sviluppo il superventricolo telencefalico si espande notevolmente fino a 11 settimane (Figura 67), per poi restringersi nelle settimane successive in seguito all'accrescimento dei gangli della base e, in particolare, all'ispessimento della neocorteccia (Altman & Bayer). Tra l'ottava e l'undicesima settimana di sviluppo la zona subventricolare della LGE prolifera enormemente aumentando di spessore, mentre la zona del mantello si organizza nel caudato e nel putamen che, a questo stadio, sono separati da una capsula interna ben strutturata (Bayer & Altman). L'analisi spazio-temporale dell'espressione di FOXP1 nella finestra di sviluppo compresa tra le 7 e le 11 settimane di sviluppo ha permesso di descrivere il graduale incremento delle dimensioni e dell'organizzazione dello striato fetale (Figura 66).



A 11w la corteccia è caratterizzata dalla presenza della zona intermedia e della *subplate*, localizzate tra la zona subventricolare e la *cortical plate*.

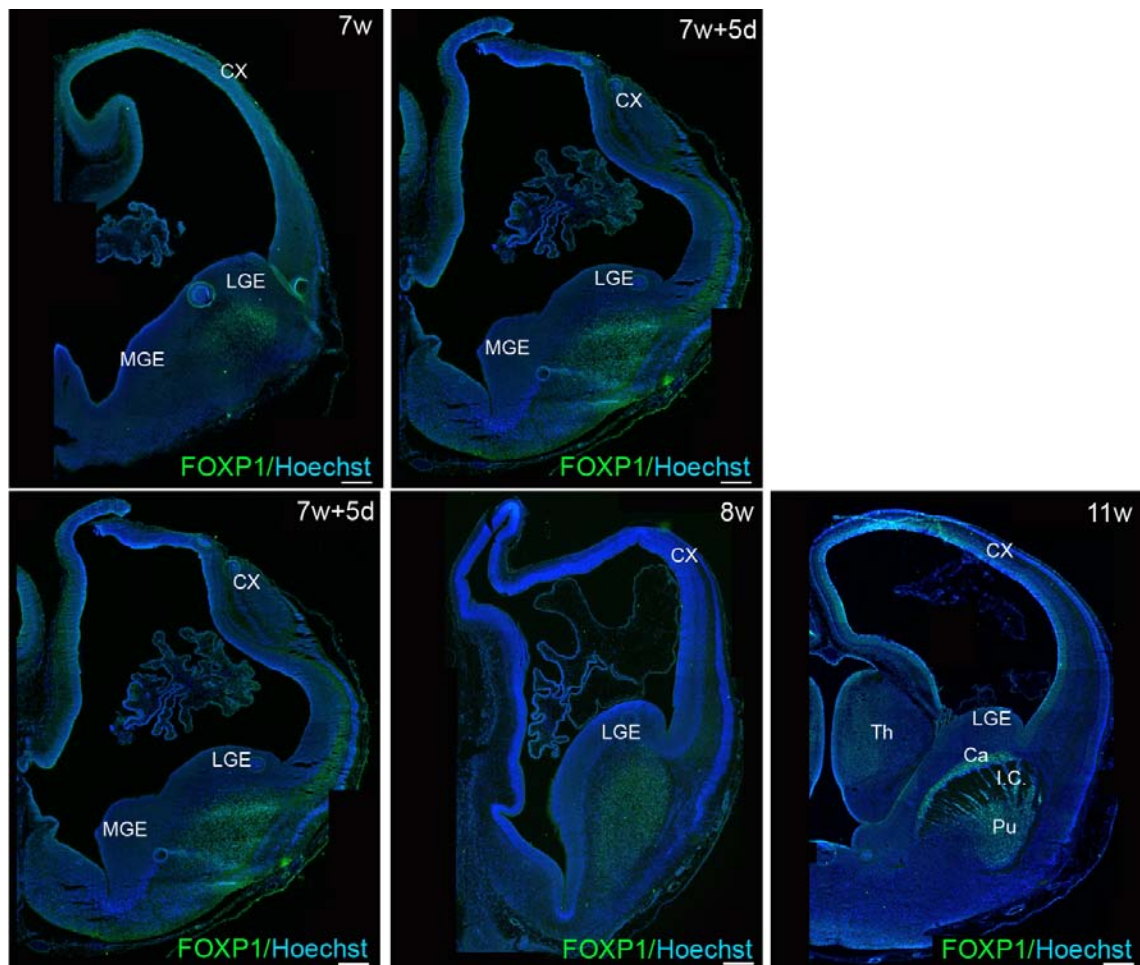


Figura 66. Profilo spazio-temporale dell'espressione di FOXP1 nell'uomo da 7 a 11 settimane.

Da un punto di vista molecolare l'organizzazione dello striato rimane invariata dall'ottava all'undicesima settimana di sviluppo.

I progenitori neuroepiteliali proliferanti della zona ventricolare continuano a esprimere i marcatori telencefalici OTX2 e FOXG1 (Figura 67). Il confine tra pallio e subpallio è definito dall'espressione mutualmente esclusiva di GSX2 e ASCL1 nella zona ventricolare della LGE, e di PAX6 in quella corticale (Figura 67).

In letteratura è descritta l'espansione del dominio di espressione di PAX6 dal telencefalo dorsale alla zona ventricolare della LGE a 12 settimane di sviluppo (Hansen et al., 2013; Ma et al., 2013). L'analisi dell'espressione di PAX6 dimostra che a 8 settimane la sua espressione è strettamente confinata nella zona ventricolare della corteccia, mentre ad 11w inizia ad essere visibile una debole espressione anche nella LGE (Figura 67). Nonostante l'espressione ventrale di PAX6 il livello di espressione tra corteccia e striato a 11 settimane è notevolmente diverso, permettendo, quindi, di continuare ad utilizzare PAX6 come marcatore di confine tra pallio e subpallio.



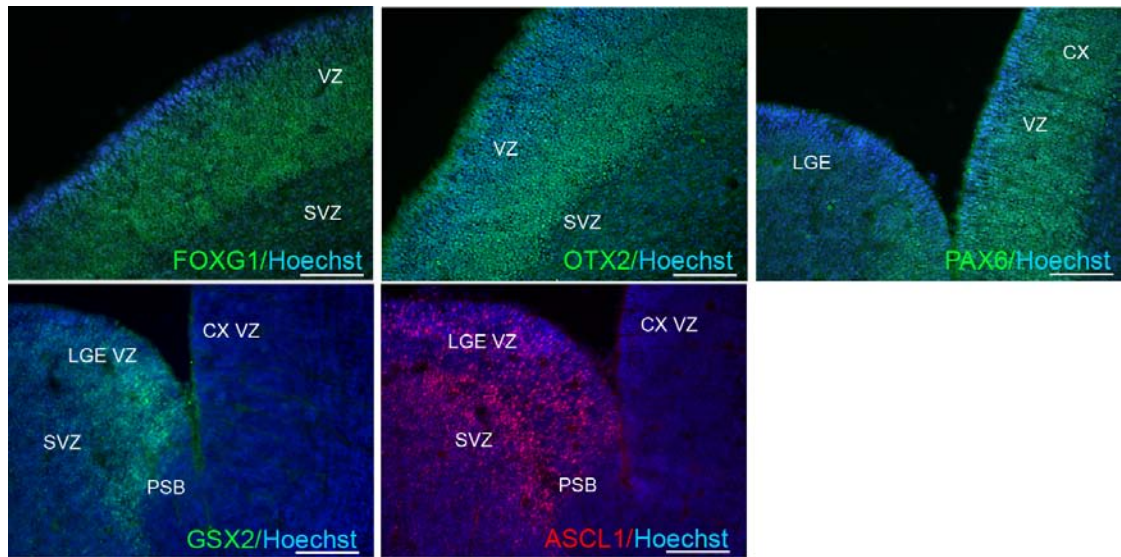


Figura 67. L'espressione di FOXP1, OTX2, PAX6, GSX2 e ASCL1 definisce la zona ventricolare del telencefalo umano a 11 settimane. Il confine tra pallio e subpallio è definito dall'espressione di ventrale ASCL1, GSX2, e da quella dorsale di PAX6.

L'espressione di fattori di trascrizione MSN-specifici è stata analizzata nel caudato e nel putamen dello striato a 11 settimane di sviluppo. ISL1, FOXP1, FOXP2 e CTIP2 sono ampiamente espressi nella quasi totalità dei neuroni striatali (Figura 68). Come descritto per i campioni più precoci (8 settimane), anche a questo stadio di sviluppo NKX2-1, in associazione con CTIP2, è abbondantemente espresso in striato (Figura 68).

L'espressione dei due più importanti marker dei neuroni striatali spinosi medi, CTIP2 e DARPP-32, è distribuita in tutto lo striato, in particolar modo nel caudato. Parallelamente all'espansione dello striato si osserva anche un aumento dei neuroni CTIP2<sup>+</sup>/DARPP-32<sup>+</sup> rispetto a 8 settimane (Figura 68).

A 11 settimane un numero elevato di neuroni corticali precoci, che andranno a costituire gli strati più profondi della corteccia, migra dalla zona ventricolare alla *cortical plate* determinandone un notevole aumento di spessore (Bayer & Altman). Come descritto in precedenza a 8 settimane, anche al termine del primo trimestre di sviluppo la *cortical plate* mostra la co-espressione di CTIP2 e DARPP-32 (Figura 68). Nell'uomo, l'espressione del GABA è presente in maniera estesa a partire da 7 settimane nella zona subventricolare e nel mantello dell'intero telencefalo ventrale (Figura 69); a questo stadio di sviluppo è già in atto la migrazione degli interneuroni GABA<sup>+</sup> dal telencefalo ventrale alla neocorteccia. A 11 settimane l'espressione di GABA interessa la zona subventricolare e caudato/putamen. Sono presenti neuroni GABAergici anche nella zona ventricolare. Come già in precedenza descritto in letteratura (Letinic et al., 2002; Zecevic et al., 2005), a livello corticale interneuroni GABAergici che migrano tangenzialmente sono presenti nella zona subventricolare e nella zona intermedia/*subplate* della neocorteccia. Un ristretto numero di cellule è presente nella zona ventricolare (Figura 69).

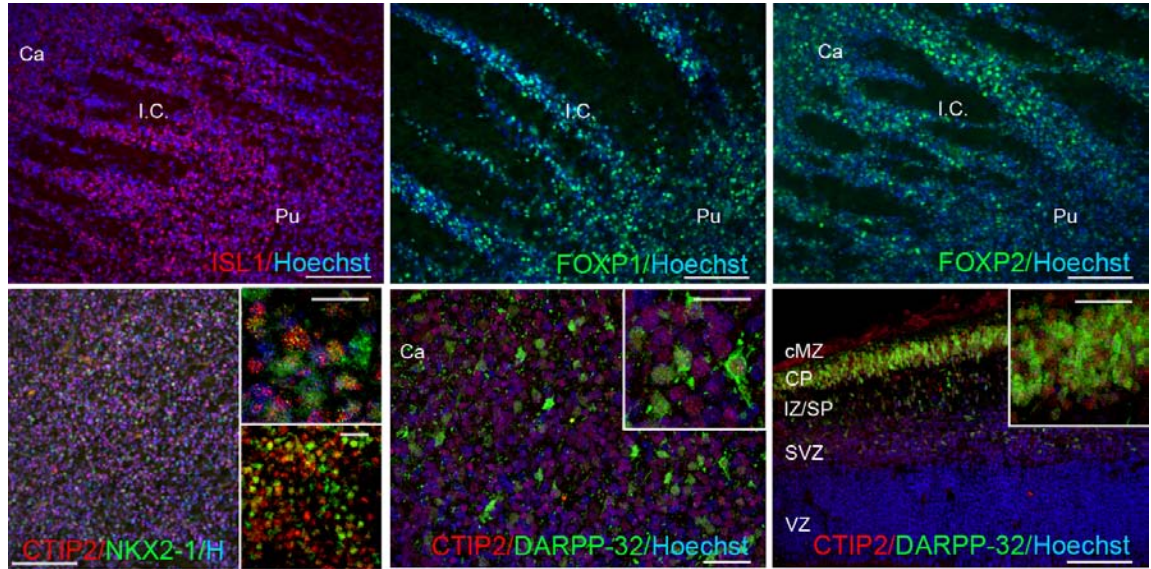


Figura 68. Espressione di ISL1, FOXP1, FOXP2, CTIP2, NKX2-1 e DARPP-32 nello striato umano a 11 settimane. CTIP2 e DARPP-32 sono co-espressi nella *cortical plate*.

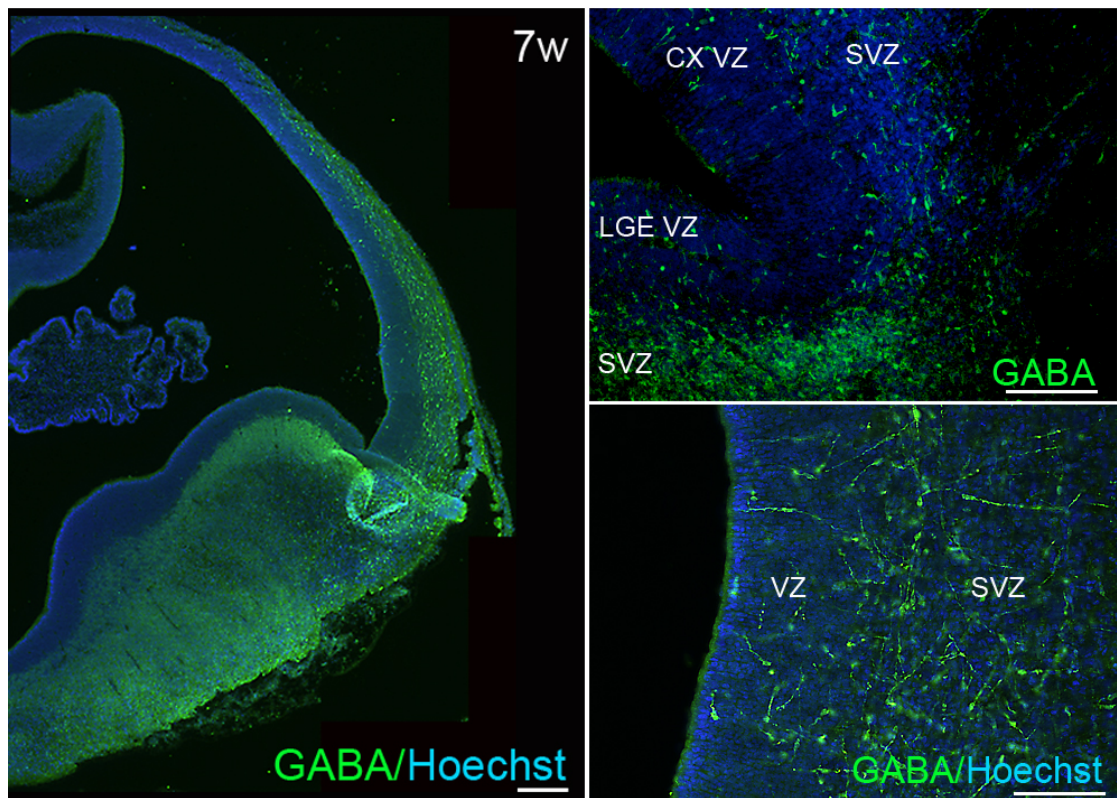


Figura 69. Profilo di espressione di GABA nel telencefalo umano a 7 settimane (sinistra). A 11 settimane sono chiaramente visibili interneuroni GABAergici migranti dalla LGE alla corteccia (destra).



L'insieme delle analisi d'immunofluorescenza ha permesso di disegnare una mappa dell'espressione di diversi fattori di trascrizione striato-specifici a 11 settimane di sviluppo (Figura 70).

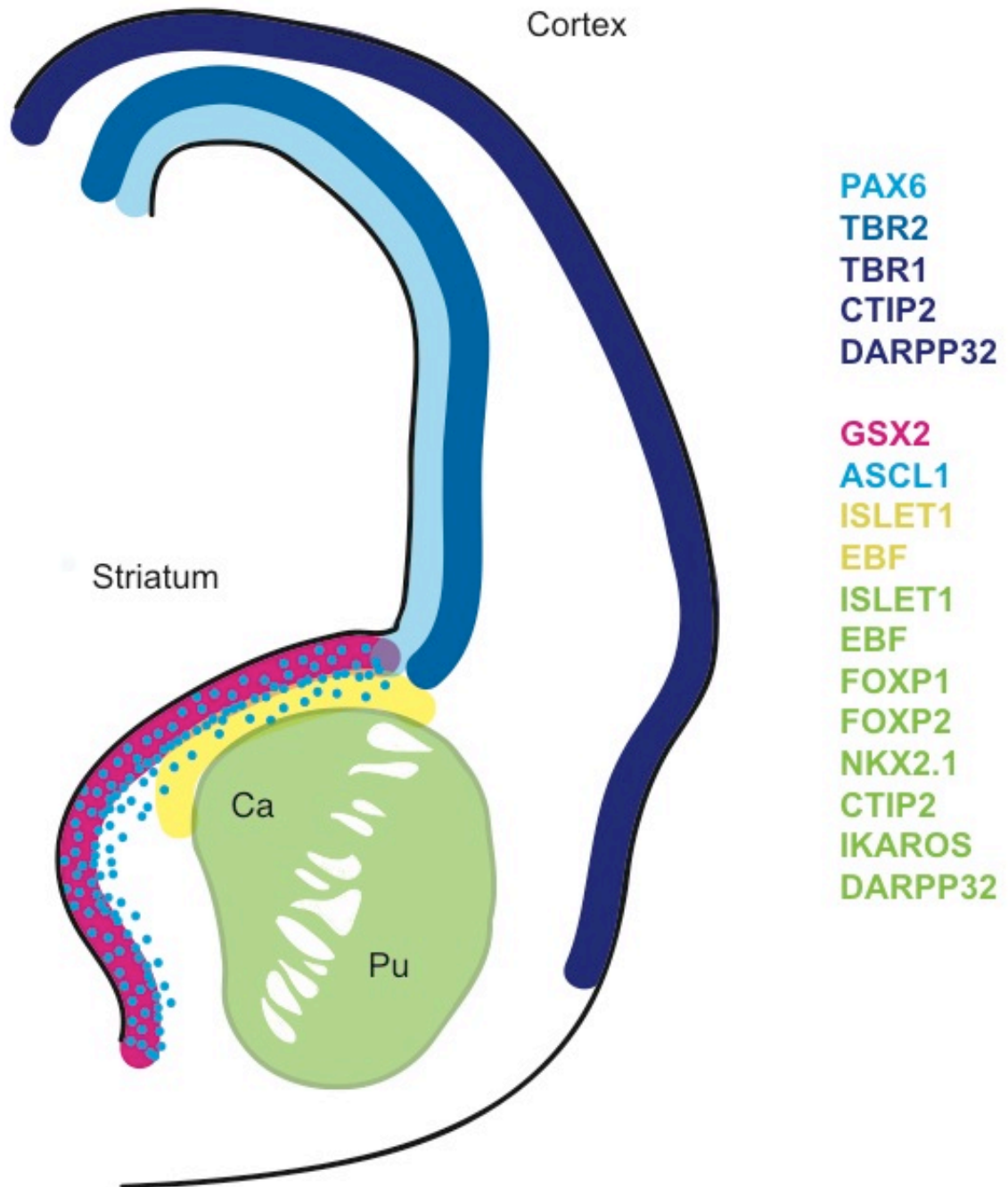


Figura 70. Schema riassuntivo dei fattori di trascrizione espressi nel telencefalo a 11 settimane.

## 2.5 Durante il secondo trimestre lo sviluppo dello striato è accompagnato da variazioni nella combinazione dei fattori di trascrizione espressi

Durante il secondo trimestre di sviluppo fetale numerose strutture embrionali, che scompaiono o che lasciano solo delle vestigia nel cervello maturo, sono ancora presenti. A livello striatale la zona ventricolare, essendo costituita da uno strato ridotto di cellule, è molto sottile al contrario della zona subventricolare, dove la neurogenesi è ancora in atto e si osserva un ulteriore ispessimento (Bayer & Altman).

La zona ventricolare e subventricolare della corteccia sono caratterizzate da uno spessore elevato, la *subplate* è andata incontro ad un'elevata espansione, i neuroni corticali iniziano a mostrare una prima organizzazione in strati. In generale la corteccia ha incrementato la sua complessità strutturale e le sue dimensioni (Bayer & Altman).

A 20 settimane la maturazione dello striato è stata accompagnata da modificazioni nel profilo di espressione di alcuni dei fattori di trascrizione analizzati rispetto alle fasi più precoci dello sviluppo fetale umano.

ASCL1 è espresso nella zona ventricolare e subventricolare della LGE senza che sia, però, evidente un accumulo di cellule ASCL1<sup>+</sup> al confine tra le due regioni (Figura 71). Mentre a 8 e 11 settimane ISL1 e EBF1 sono espressi nei progenitori striatali della zona subventricolare e dai neuroni post-mitotici del mantello, a 20 settimane la loro espressione risulta ristretta esclusivamente nel caudato/putamen, ad eccezione di un numero estremamente ridotto di cellule positive nella zona subventricolare soprastante (Figura 71). In aggiunta è stata osservata una riduzione del numero di neuroni ISL1<sup>+</sup>, molti dei quali, al contrario di quanto osservato più precocemente, non co-esprimono FOXP1, FOXP2 o CTIP2 (Figura 71), suggerendo l'acquisizione di un fenotipo interneuronale. Questo profilo di espressione è in accordo con quanto descritto nel ratto, in cui ISL1 è inizialmente espresso in tutti i progenitori striatali e, in seguito, la sua espressione si restringe esclusivamente agli interneuroni colinergici (Wang and Liu, 2001).

FOXP2 è il fattore di trascrizione che ha modificato maggiormente il suo profilo di espressione. In generale è stata osservata una forte riduzione nei livelli di espressione di FOXP2 nello striato, con un numero ridotto di neuroni in cui FOXP2 è presente a elevati livelli, al contrario di quanto osservato a 8 e 11 settimane in cui era estesamente espresso nella quasi totalità dei neuroni. In particolare, nelle cellule in cui i livelli di espressione di FOXP2 si sono mantenuti elevati, non è stata riscontrata l'espressione CTIP2, ISL1 o EBF1 (Figura 71).

Come nel caso di ISL1 e FOXP2, anche NKX2-1 ha ristretto la sua espressione a una piccola percentuale di cellule nello striato. Analisi di co-espressione con CTIP2 hanno evidenziato la presenza di una popolazione CTIP2<sup>+</sup>/NKX2-1<sup>-</sup> e di una CTIP2<sup>-</sup>/NKX2-1<sup>+</sup> (Figura 71). In aggiunta è stata osservata una quasi totale segregazione tra NKX2-1

e ISL1, in contrasto con il pattern di co-espressione descritto a 8 settimane. Le rare cellule ISL1<sup>+</sup>/NKX2-1<sup>+</sup> osservate potrebbero rappresentare i precursori degli interneuroni colinergici.

FOXP1 e CTIP2 hanno mantenuto un profilo di espressione uguale a quello descritto nelle settimane di sviluppo precedenti, con cellule positive nel caudato e nel putamen ed un'assenza di segnale nella zona subventricolare (Figura 71).



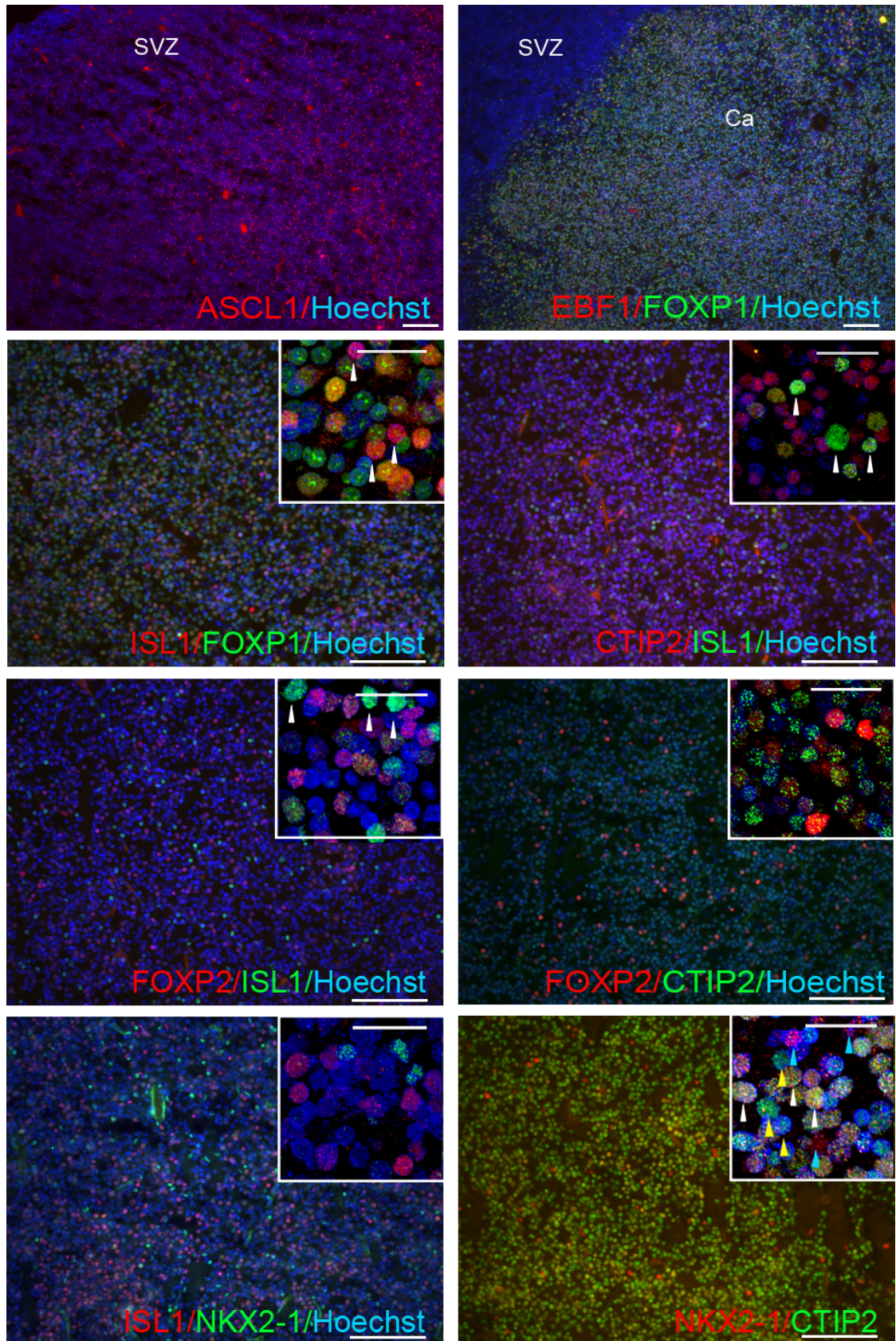


Figura 71. Profilo di espressione di ASCL1, EBF1, ISL1, FOXP1, FOXP2, NKX2-1 nello striato umano a 20 settimane di sviluppo.



Nello striato a 20 settimane i neuroni CTIP2<sup>+</sup> presentano un profilo GABAergico (Figura 72) ed una estesa co-espressione con DARPP-32 (Figura 72). L'acquisizione mediante microscopia confocale ha evidenziato la morfologia ancora immatura dei neuroni, con la maggior parte delle cellule ancora priva di neuriti (Figura 72).

Di particolare interesse è la presenza di neuroni striatali DARPP-32<sup>+</sup>/ISL1<sup>+</sup>. Questa osservazione è in disaccordo con il profilo di espressione del ratto dove l'espressione di DARPP-32 è conseguente alla down-regolazione di ISL1 e non sono descritti neuroni di proiezione striatali ISL1<sup>+</sup> (Wang and Liu, 2001) (Figura 72).

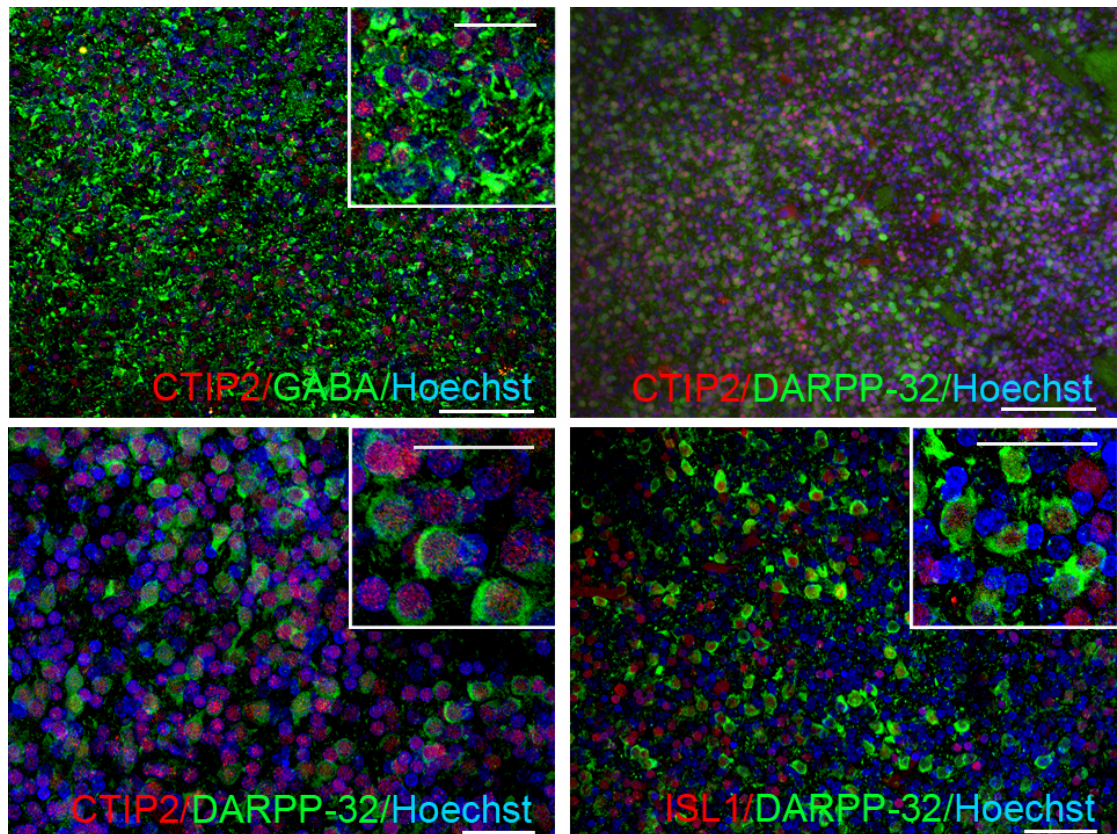


Figura 72. Profilo di espressione di dei MSN nello striato umano a 20 settimane di sviluppo.

Nei roditori una sotto-popolazione di neuroni di proiezione, durante lo sviluppo striatale, esprime il fattore di trascrizione Ikaros la cui espressione è essenziale per l'acquisizione del fenotipo encefalinergico (Martin-Ibanez et al., 2010).

Anche durante lo sviluppo umano è stata identificata una popolazione di neuroni striatali positiva per IKZ1. Al contrario di quanto descritto nel topo, nell'uomo i neuroni IKZ<sup>+</sup> non si accumulano al confine tra zona subventricolare e mantello (Martin-Ibanez et al., 2010). Parallelamente, i neuroni IKZ1<sup>+</sup> sono risultati negativi per CR, una proteina legante il calcio che identifica gli interneuroni striatali (Figura 73). Al contrario Calbindina (CALB) è espressa in tutto il caudato e putamen (Figura 73), in accordo con la sua espressione descritta nei MSN e negli interneuroni striatali in topo (Gerfen et al., 1985; Kiyama et al., 1990; Bernacer et al., 2013).

Lo striato è il principale target sinaptico dei neuroni dopaminergici della *substantia nigra pars compacta*, i quali regolano l'attività dei neuroni striatali di proiezione e degli interneuroni striatali (Bracci et al., 2002). Fibre TH<sup>+</sup> sono state identificate a partire da 7 settimane di sviluppo. A 20 settimane i neuroni di proiezione CTIP2<sup>+</sup> sono risultati ampiamenti innervati da neuroni dopaminergici TH<sup>+</sup> (Figura 73).

Il 10% della popolazione striatale è costituita da interneuroni originati nella MGE e CGE (Kreitzer, 2009), che possono essere classificati, sulla base del neurotrasmettitore impiegato, in interneuroni GABAergici o colinergici. Gli interneuroni GABA<sup>+</sup> possono essere ulteriormente suddivisi in 3 sottotipi: (i) parvalbumina-positivi, (ii) somatostatina-, NPY-, NOS-positivi e (iii) calretinina-positivi.

A 20 settimane sono stati visualizzati interneuroni CR<sup>+</sup> e rari interneuroni SST<sup>+</sup>/NPY<sup>+</sup> caratterizzati da lunghe arborizzazioni dendritiche (Figura 73).

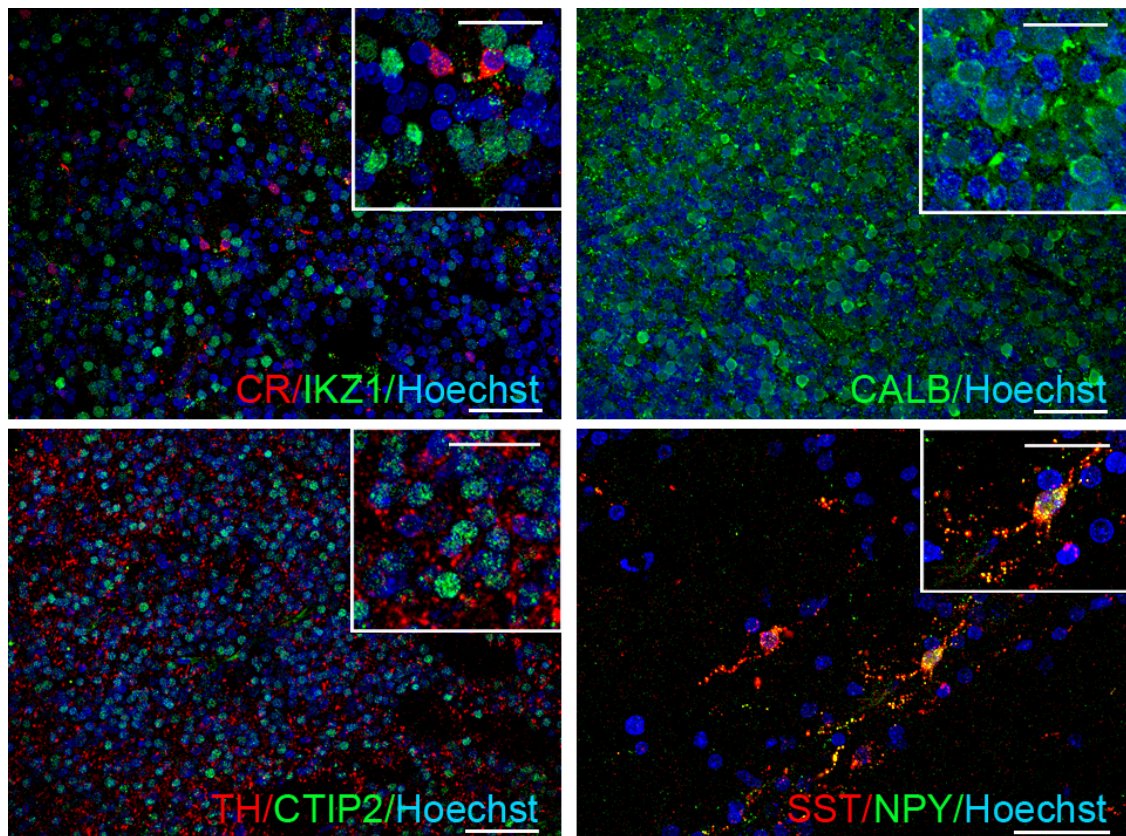


Figura 73. Profilo di espressione di IKZ1 e CALB nei neuroni striatali umani. I neuroni spinosi medi sono contattati da neuroni dopaminergici TH<sup>+</sup>. A 20 settimane di sviluppo nello striato sono presenti anche interneuroni CR, SST e NPY positivi.

L'estesa analisi di co-espressione di diversi fattori di trascrizione striato-specifici ha permesso di tracciare il profilo di espressione dello striato a 20 settimane di sviluppo (Figura 74).



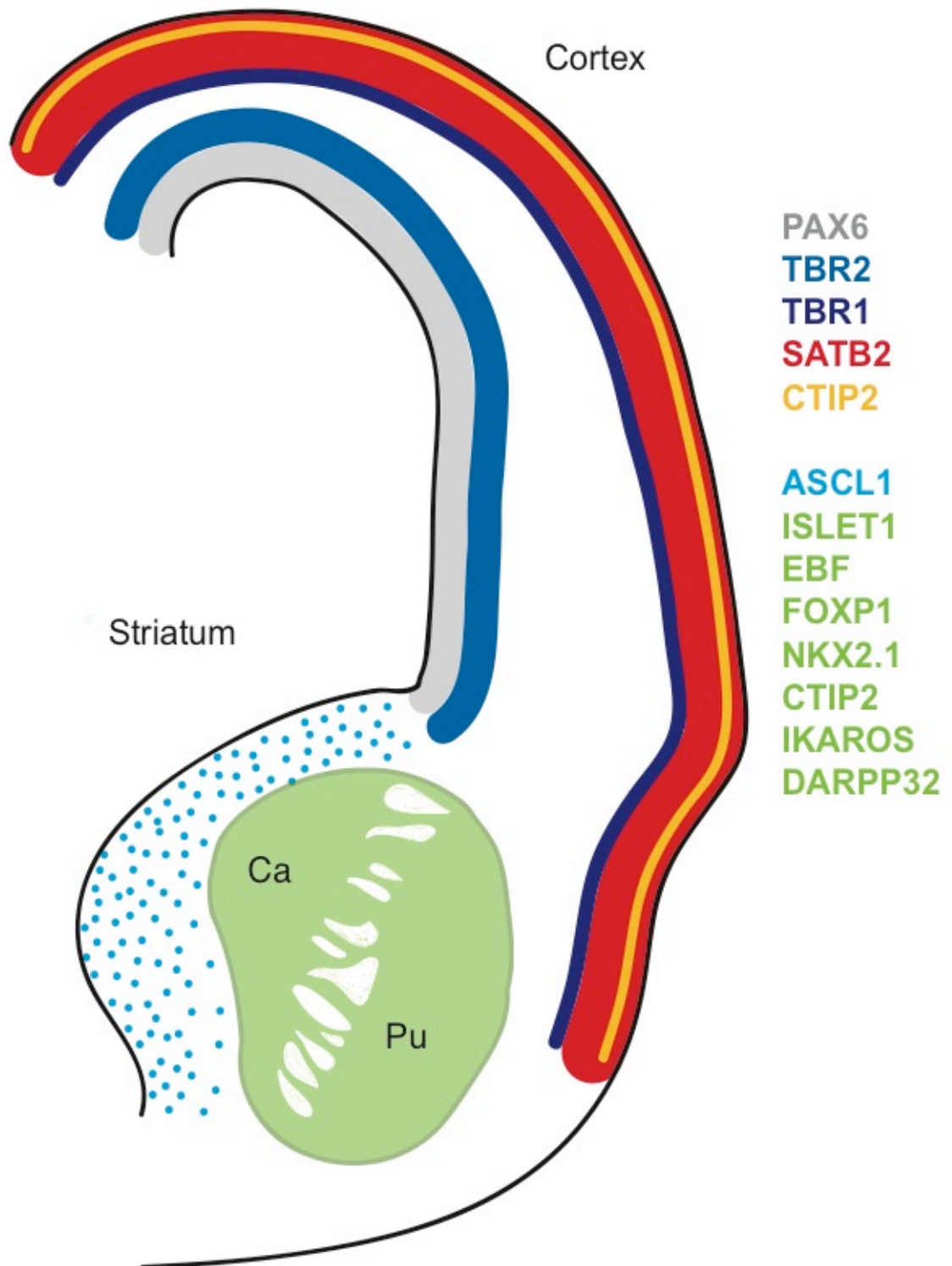


Figura 74. Schema riassuntivo dei fattori di trascrizione espressi nel telencefalo a 11 settimane.

## 2.6 Fattori di trascrizione striato-arricchiti sono espressi, ma non co-espressi, nella corteccia in sviluppo

Il pattern molecolare che definisce i neuroni di proiezione dello striato è il risultato della co-espressione di fattori di trascrizione, proteine citosoliche e neurotrasmettitori, alcuni dei quali sono espressi anche in altre regioni del cervello, in particolar modo nella neocorteccia. Per meglio descrivere l'identità striatale e distinguere il *pattern* di co-espressione striatale e corticale è stata eseguita un'analisi di espressione dei fattori di trascrizione striatali nella corteccia a 20 settimane di sviluppo.

Durante lo sviluppo, dai precursori neuroepiteliali PAX6<sup>+</sup> della zona ventricolare e i progenitori TBR2<sup>+</sup> della zona subventricolare hanno origine i neuroni di proiezione corticali che, al termine dello sviluppo, sono organizzati in 6 strati. La corteccia cerebrale si sviluppa secondo un ordine *inner to outer* tramite il quale i primi neuroni a essere originati sono quelli che andranno a costituire gli strati più profondi della corteccia (VI-V) (Bystron et al., 2008), seguiti in seguito dai neuroni degli strati IV, III e II.

I neuroni all'interno di ciascuno strato sono generati a tempi specifici e sono caratterizzati da una morfologia e da un profilo di espressione e di connessioni simili.

A 20 settimane la porzione superficiale della *cortical plate* si presume sia costituita dai neuroni dello strato IV (granulari), III e II (supragranulari), mentre la porzione profonda dai neuroni infragranulari degli strati VI e V (Bayer & Altman).

A 20 settimane l'espressione di CTIP2, FOXP1, FOXP2, NKX2-1, GABA, CALB e CR è stata osservata anche in corteccia con un profilo di co-espressione differente da quello descritto in striato.

In particolare, mentre CTIP2 è stato osservato in una sottopopolazione di neuroni della porzione superficiale della *cortical plate*, neuroni FOXP2<sup>+</sup> sono stati identificati nella porzione profonda della *cortical plate* e nella *subplate* (Figura 75). Non sono state individuate cellule CTIP2<sup>+</sup>/FOXP2<sup>+</sup> come descritto in striato (Figura 75).

Neuroni FOXP1<sup>+</sup> sono localizzati nell'intero spessore della *cortical plate*, in accordo con le osservazioni effettuate in topo secondo le quali FOXP1 è espresso nei neuroni di proiezione corticali degli strati IV, V e VI (Hisaoka et al., 2010) (Figura 75). Infine NKX2-1 è stato osservato solamente nella *cortical plate* della corteccia frontale (Figura 75).

A 20 settimane la *cortical plate* è caratterizzata dalla presenza di interneuroni CR<sup>+</sup> e CALB<sup>+</sup> (Figura 75).

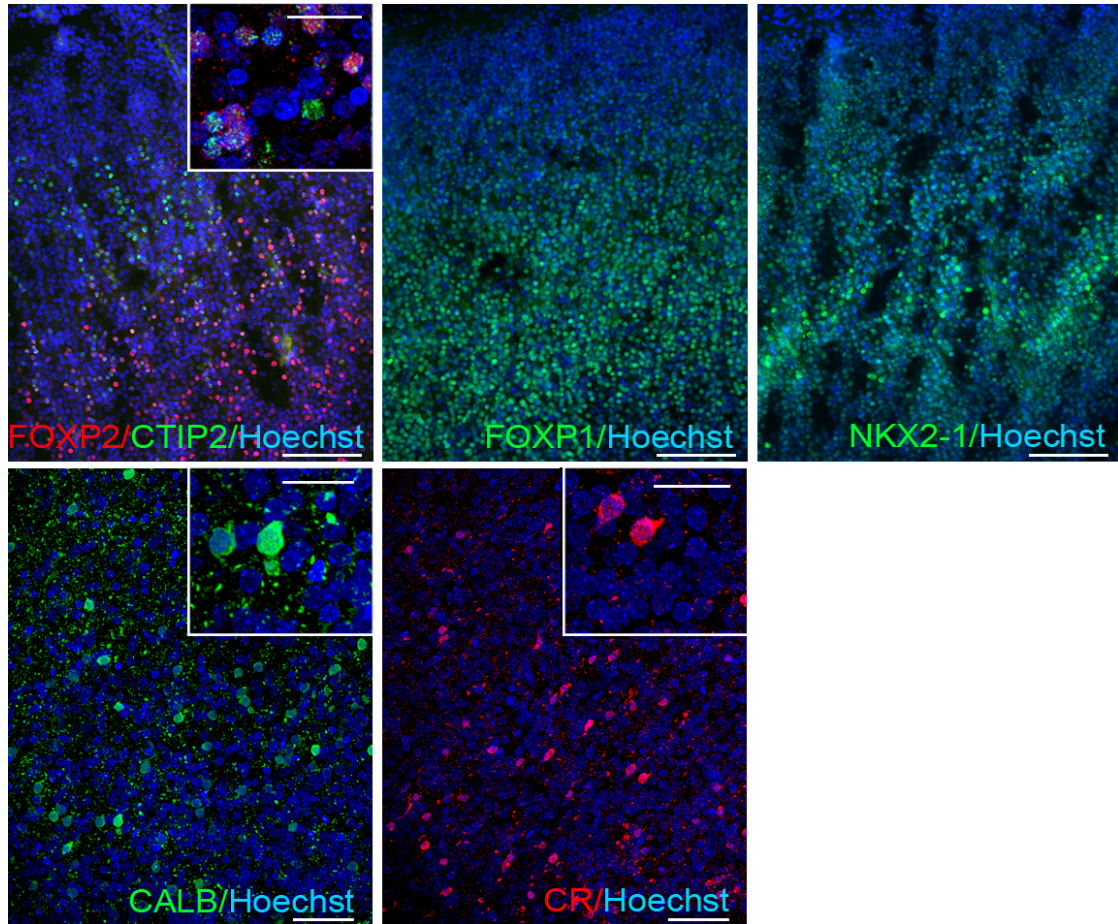


Figura 75. Profilo di espressione dei determinanti striato- specifici FOXP2, CTIP2, FOXP2, NKX2-1, CALB, CR nella corteccia umana a 20 settimane.

CTIP2 è uno principali marcatori impiegati per l'identificazione dei neuroni striatali di proiezione. Parallelamente è espresso, a partire da 7 settimane di sviluppo nella *cortical plate*. L'analisi di co-espressione ha dimostrato che i neuroni corticali CTIP2<sup>+</sup> non sono GABAergici, escludendo la possibilità che siano interneuroni. Partendo da questo presupposto la definizione del pattern di co-espressione di CTIP2 con fattori di trascrizione corticali striato-specifici è risultata di fondamentale importanza.

A 20 settimane SATB2, un marcatore di neuroni corticali tardivi degli strati I e II (Britanova et al., 2008), è espresso sia nella porzione superficiale della *cortical plate* che in quella profonda dove è co-espresso con TBR1, che identifica i neuroni dello strato VI (Hevner et al., 2001) (Figura 76). L'espressione di TBR1 si estende anche a livello della *subplate* (Figura 76). I neuroni CTIP2<sup>+</sup> non co-esprimono FOXP2 (Figura 62), SATB2 o TBR1 (Figura 76), al contrario di quanto osservato a 8 e 11 settimane, quando la totalità delle cellule della *cortical plate* era CTIP2<sup>+</sup>/TBR1<sup>+</sup>.



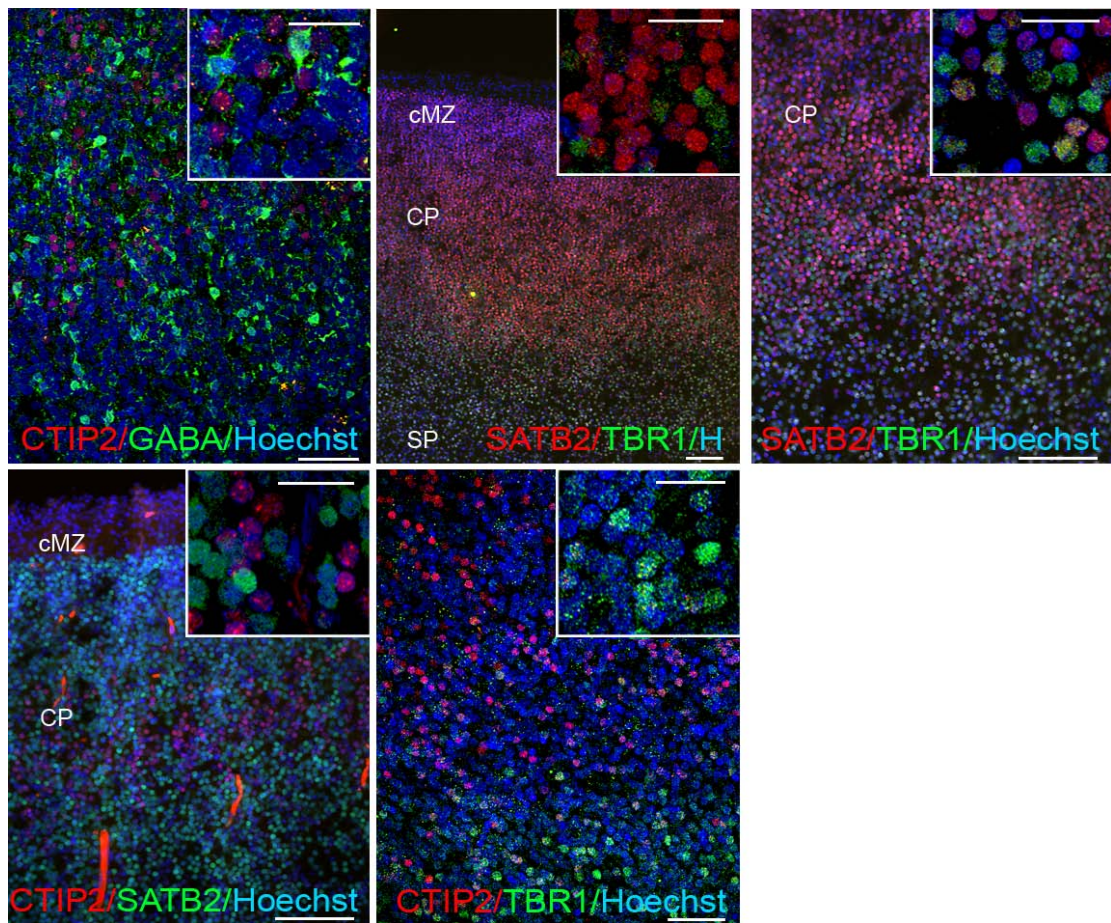


Figura 76. Profilo di co-espressione dei neuroni CTIP2<sup>+</sup> nella corteccia umana a 20 settimane.

Durante il primo trimestre di sviluppo la *cortical plate* è caratterizzata anche dalla co-espressione di CTIP2 e DARPP-32. A 20 settimane DARPP-32 è espresso nella porzione profonda della *cortical plate* e nella *subplate* (Figura 64). Analisi di co-espressione hanno dimostrato che DARPP-32 è espresso nei neuroni FOXP2<sup>+</sup> e FOXP1<sup>+</sup> nella *cortical plate* (Figura 77). Al contrario di quanto descritto a tempi più precoci, a 20 settimane solo rare cellule sono risultate CTIP2<sup>+</sup>/DARPP-32<sup>+</sup>. Infine non sono stati osservati neuroni corticali DARPP-32 esprimenti TBR1, SATB2 e GABA (Figura 77).



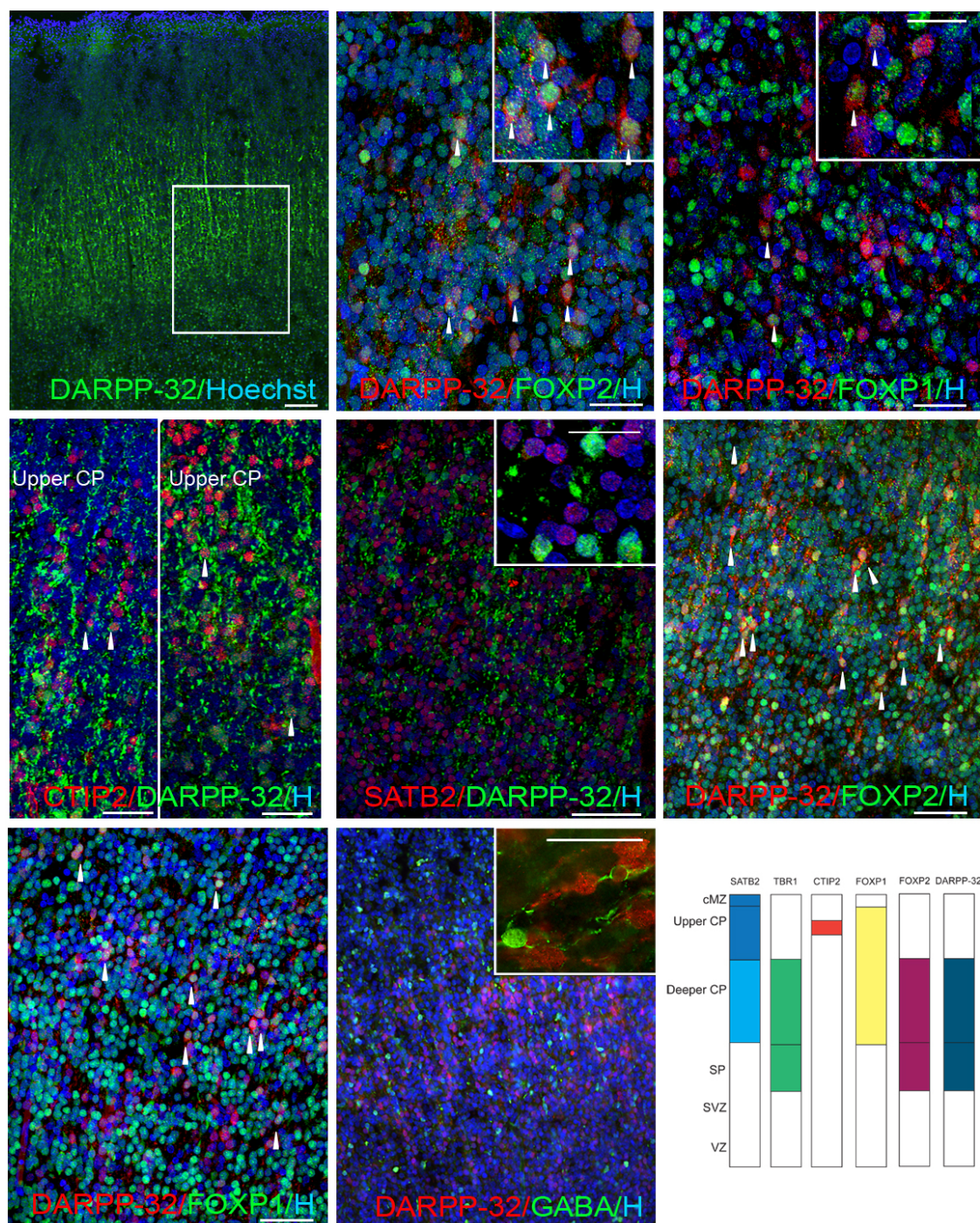


Figura 77. Profilo di co-espressione dei neuroni DARPP-32<sup>+</sup> nella corteccia umana a 20 settimane. Schema riassuntivo dell'espressione in corteccia dei fattori di trascrizione studiati.

### **3. Caratterizzazione trascrizionale, molecolare ed elettrofisiologica di neuroni primari umani**

## **RISULTATI**



### 3.1 Il profilo trascrizionale e molecolare regione-specifico dei neuroni primari è mantenuto dopo il differenziamento *in vitro*

Le analisi trascrizionali e d'immunoistochimica hanno permesso di descrivere l'architettura molecolare dello striato e della neocorteccia durante lo sviluppo fetale umano da 2 fino a 20 settimane.

Allo scopo di determinare il profilo funzionale del telencefalo fetale, colture primarie sono state derivate da tessuto striatale e corticale fresco e differenziate *in vitro*. Dei neuroni primari ottenuti (hPNs) è stato investigato il profilo trascrizionale, sulla base del quale sono state infine condotte analisi elettrofisiologiche.

Progenitori neurali Nestin<sup>+</sup> mantengono *in vitro* l'espressione di fattori di trascrizione regione-specifici; in particolare i progenitori striatali esprimono GSX2 e FOXG1, mentre quelli corticali PAX6 e TBR2 (Figura 78, pannello superiore). L'esposizione a uno specifico terreno di differenziamento ha permesso di ottenere, dopo 30 giorni, neuroni striatali maturi CTIP2<sup>+</sup>/GABA<sup>+</sup>, DARPP-32<sup>+</sup>/MAP2<sup>+</sup> e DARPP-32<sup>+</sup>/CTIP2<sup>+</sup>. Al contrario progenitori corticali hanno differenziato in neuroni glutamatergici TBR1<sup>+</sup>/βIII-tub<sup>+</sup> e VGlut1<sup>+</sup>/CTIP2<sup>+</sup> (Figura 78, pannello inferiore).

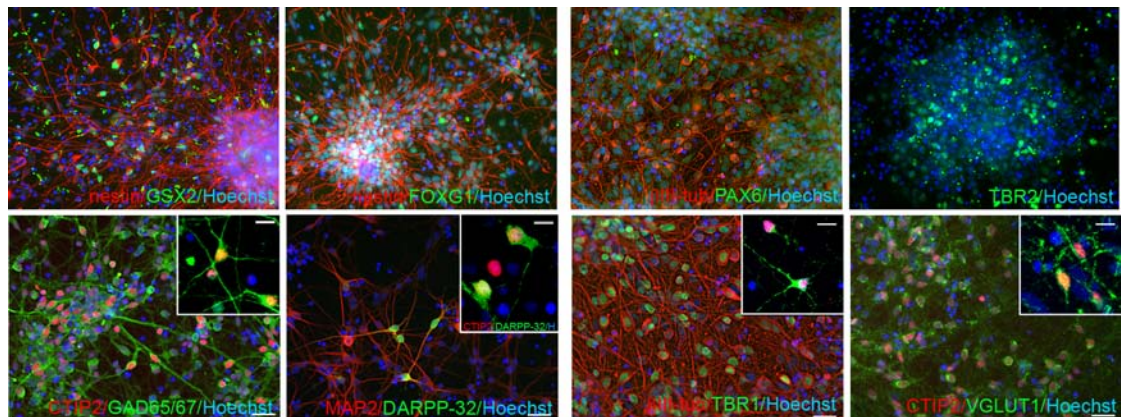


Figura 78. I progenitori neurali derivati da strato e corteccia mantengono *in vitro* l'espressione di marcatori regione-specifici (pannello superiore), ed in seguito a differenziamento, danno origine a neuroni striatali e corticali maturi (pannello inferiore).

L'analisi trascrizionale è stata eseguita su 3 campioni di hPNs striatali e corticali al giorno 30 di differenziamento. I dati ottenuti sono stati aggiunti al *data-set* proveniente dai campioni *in vivo* allo scopo di determinare se i 1306 DEG identificati fossero in grado di discriminare propriamente i neuroni striatali e corticali ottenuti *in vitro* come accade *in vivo*. L'analisi di *unsupervised hierarchical clustering* dimostra che il profilo di espressione identificato *in vivo* è mantenuto *in vitro*, e che i neuroni primari possono essere, sulla base dei geni differenzialmente espressi, classificati sulla base del tessuto di origine (Figura 79).

Parallelamente è stata eseguita anche un'analisi di *class discovery* che ha identificato 133 geni bimodali che discriminano il tessuto dai campioni *in vitro*. Tra i BEG

identificati, citiamo l'emoglobina gamma A, B e  $\alpha 2$  che sono espresse *in vivo* ma non nei neuroni differenziati *in vitro* (Figura 79).

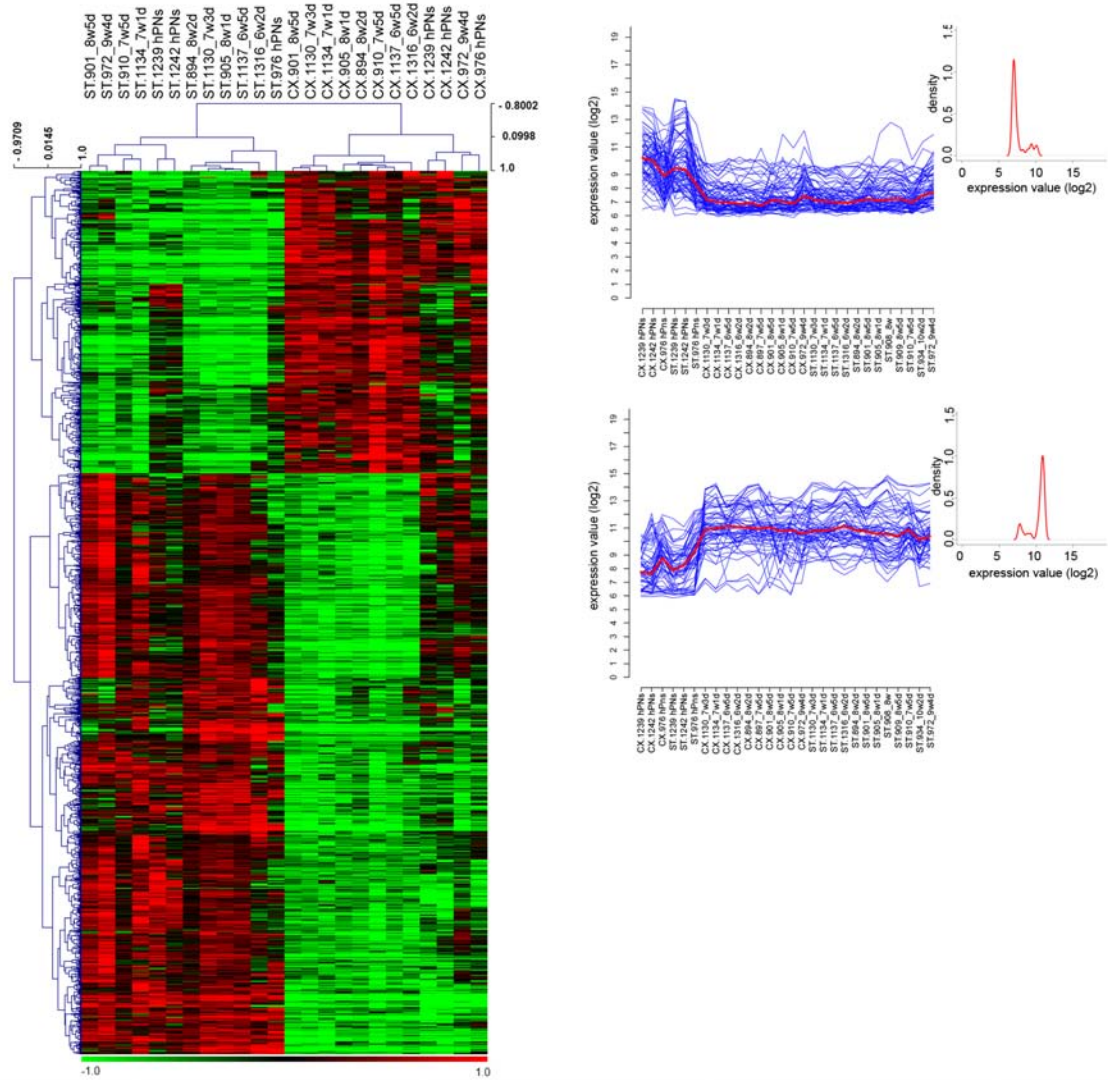


Figura 79. L'analisi di *unsupervised hierarchical clustering* (pannello di sinistra) dimostra che i neuroni primari possiedono un profilo trascrizionale simile a quello del tessuto striatale o corticale ottenuto dall'analisi di *class comparison* effettuata *in vivo*. L'analisi di *class discovery* (pannello di destra) ha identificato 133 geni bimodali che distinguono i campioni *in vivo* dai neuroni primari ottenuti *in vitro*.

### 3.2 Il differenziamento *in vitro* dei neuroni primari determina un cambiamento trascrizionale rispetto al tessuto fetale di partenza associato a un'aumentata maturazione e funzionalità

L'analisi di *unsupervised hierarchical clustering* ha dimostrato che i precursori neurali sono in grado di differenziare verso il tipo neuronale atteso sulla base del tessuto di origine, mantenendo un profilo trascrizionale regione-specifico. Il differenziamento *in vitro*, in parallelo, determina una trasformazione della popolazione di partenza in un tipo cellulare diverso, più maturo e, possibilmente, funzionale. Allo scopo di determinare l'entità di questo differenziamento e maturazione è stata eseguita un'analisi di *class comparison* tra i neuroni primari striatali differenziati *in vitro* per 30 giorni e i campioni di tessuto striatale a 8 settimane (l'età dei feti da cui sono state derivate le colture primarie) che corrisponde al giorno zero del differenziamento. Lo stesso tipo di approccio è stato seguito anche per i campioni *in vitro* e *in vivo* di corteccia.

L'analisi ha identificato 186 geni differenzialmente espressi che distinguono il tessuto striatale dai neuroni primari, e 1018 geni che discriminano l'*in vivo* dall'*in vitro* corticale (Figura 80). Le analisi della componente principale e di *hierarchical clustering* suggeriscono che il risultato sia la conseguenza della presenza di un'ampia zona del mantello nello striato a 8 settimane ricca di neuroni già differenziati. L'analisi della corteccia, al contrario, ha identificato un elevato numero di DEG in quanto a 8 settimane il tessuto è costituito principalmente dalla zona ventricolare e subventricolare dove sono localizzati i precursori neurali che, una volta *in vitro*, differenziano a neuroni corticali con una elevata efficienza. Il carattere indifferenziato della corteccia a 8 settimane è confermato anche dall'arricchimento in geni associati alla proliferazione cellulare identificato dall'analisi di *gene ontology* del modulo M2.

L'analisi di *gene ontology* dei DEG di striato e di corteccia ha rivelato classi associate a proprietà di neuroni maturi come “*coating* di vescicole sinaptiche” (Figura 80).

Tra i geni differenzialmente espressi sono compresi numerosi geni codificanti per canali ionici voltaggio-controllati e recettore-associati a dimostrazione di un arricchimento di geni funzionali nei neuroni primari differenziati *in vitro*.



## RISULTATI

### 3. Caratterizzazione trascrizionale, molecolare ed elettrofisiologica di neuroni primari umani striatali e corticali

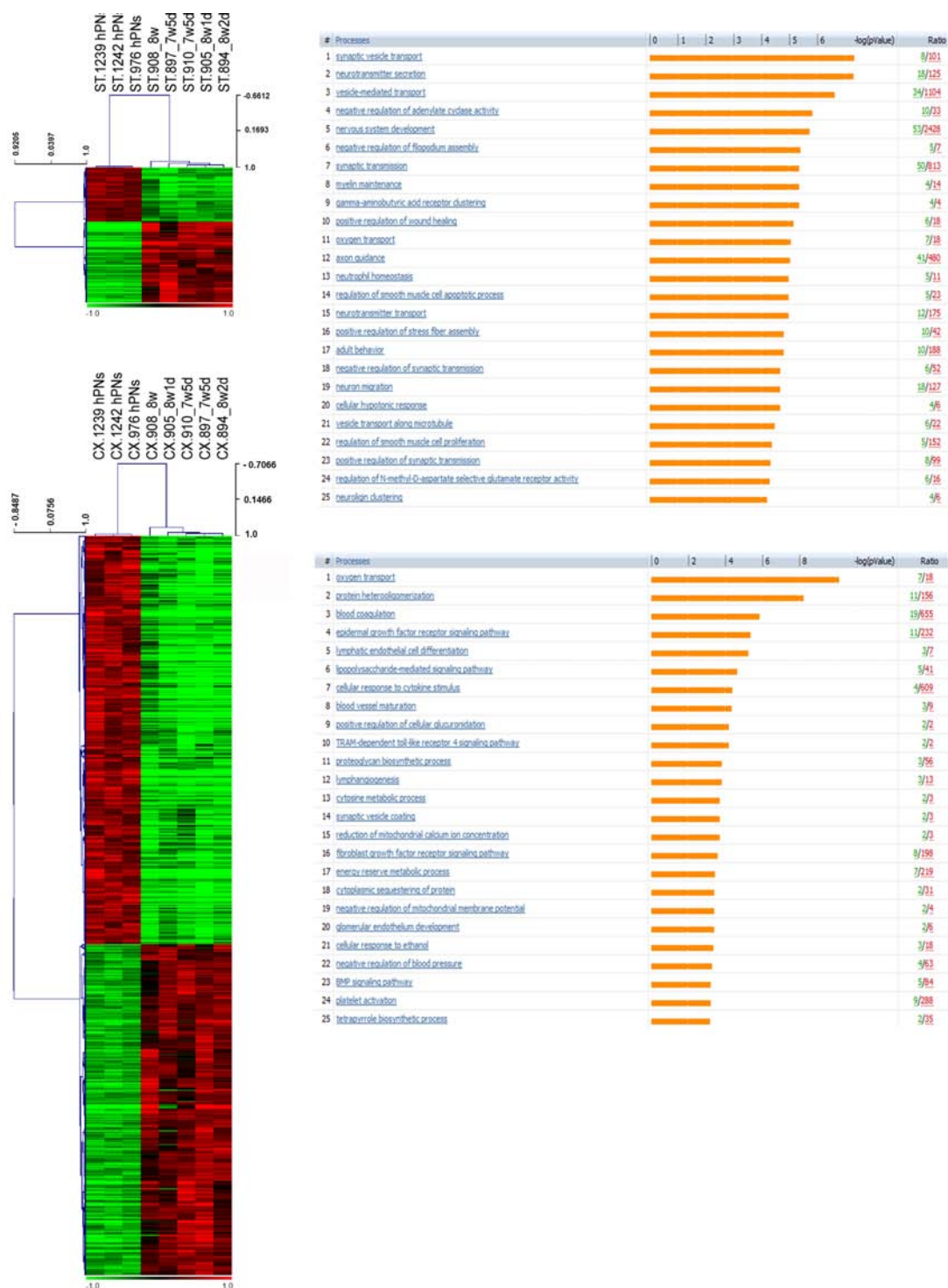


Figura 80. L'analisi di *class comparison* ha identificato i geni differenzialmente espressi tra i campioni *in vivo* e *in vitro* di striato (pannello superiore) e corteccia (pannello inferiore). L'analisi di *gene ontology* dei DEG di striato e di corteccia ha rivelato classi associate a proprietà di neuroni maturi

### 3.3 Neuroni primari striatali e corticali possiedono caratteristiche elettrofisiologiche di neuroni maturi

Ad eccezione di un numero limitato d'informazioni sui neuroni umani corticali derivanti da registrazioni in fettina (Moore et al., 2011), poco è noto circa le caratteristiche elettrofisiologiche dei neuroni primari striatali e corticali. Per monitorare nel tempo la funzionalità dei neuroni primari, le cellule sono state analizzate con la tecnica del *patch-clamp* in configurazione di *whole-cell* in modalità *voltage-* e *current-clamp* a diversi intervalli di tempo durante il differenziamento: 3-5, 14-20 e 20-30 *day in vitro* (DIV). I neuroni registrati sono stati iniettati con biocitina e analizzati dopo la registrazione mediante immunofluorescenza per CTIP2 e VGLUT1 allo scopo di post-marcare le cellule striatali e corticali, rispettivamente (Figura 81).

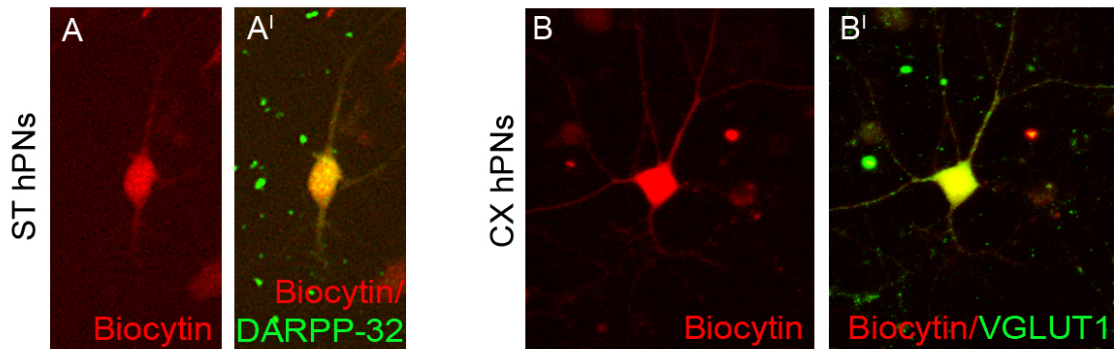


Figura 81. Neuroni striatali DARPP-32<sup>+</sup> (A) e corticali CTIP2<sup>+</sup> (B) marcati con biocitina.

Abbiamo analizzato dapprima le proprietà passive delle cellule, ovvero la capacità di membrana ( $C_m$ ), direttamente correlata con le dimensioni della cellula, la resistenza d'ingresso ( $R_{in}$ ) e il potenziale di membrana a riposo ( $V_r$ ). Come mostrato in Tabella 4, questi parametri non variano in maniera significativa tra i diversi tempi analizzati.

	striatal hPNs			cortical hPNs		
	Cm	Rin	Vr	Cm	Rin	Vr
	(membrane capacitance)	(input resistance)	(resting membr potential)	(membrane capacitance)	(input resistance)	(resting membr potential)
DIV	pF	GΩ	mV	pF	GΩ	mV
3-5	26.1± 12.4 (n=4)	1.8±0,5 (n=4)	-53.1±17.5 (n=2)	26.1± 12.4 (n=4)	1.8±0,5 (n=4)	-53.1±17.5 (n=2)
13-20	29.5±3.4 (n=41)	1.38±0,1 (n=41)	-42.1±1.8 (n=11)	29.5±3.4 (n=41)	1.38±0,1 (n=41)	-42.1±1.8 (n=11)
> 20	27.9±2.7 (n=59)	1.3±0,1 (n=59)	-47.5±4.3 (n=15)	27.9±2.7 (n=59)	1.3±0,1 (n=59)	-47.5±4.3 (n=15)

Tabella 4. Proprietà elettrofisiologiche passive dei neuroni primari striatali e corticali. Tra parentesi è indicato il numero totale di cellule analizzate.

Una caratteristica comune e distintiva dei neuroni maturi è la capacità di generare potenziali d'azione sopra-soglia sensibili a tetrodossina (TTX) e di organizzarli in specifici *pattern* di scarica (*firing*).

Dopo la terza settimana di differenziamento un'elevata percentuale di neuroni primari striatali e corticali è in grado di produrre potenziali d'azione singoli oppure un *firing* ripetitivo in risposta all'iniezione di gradini di corrente depolarizzante (Figura 82A, B). Sia nei neuroni primari striatali sia in quelli corticali è stata identificata una correlazione tra questa capacità e l'attivazione di correnti di Na<sup>+</sup>, mediate da canali al sodio voltaggio dipendenti veloci, e correnti di K<sup>+</sup> mediate da canali al potassio voltaggio dipendenti di tipo *delayed-rectifier* (Figura 82C, E). Questi risultati dimostrano la presenza di canali al sodio e confermano l'arricchita espressione del gene SCNA2 nei neuroni primari striatali rispetto al tessuto d'origine evidenziata dall'analisi di *class comparison*.

L'analisi della cinetica di attivazione ed inattivazione delle correnti entranti e la sensibilità a TTX (1μM) suggeriscono inequivocabilmente che queste correnti sono dovute al flusso entrante di ioni sodio attraverso canali voltaggio dipendenti (Figura 82D). Questa conclusione è confermata dalla curva che rappresenta la relazione densità di corrente/voltaggio (Figura 82F), la quale non differisce significativamente da quella relativa ai neuroni primari corticali (Figura 82G).

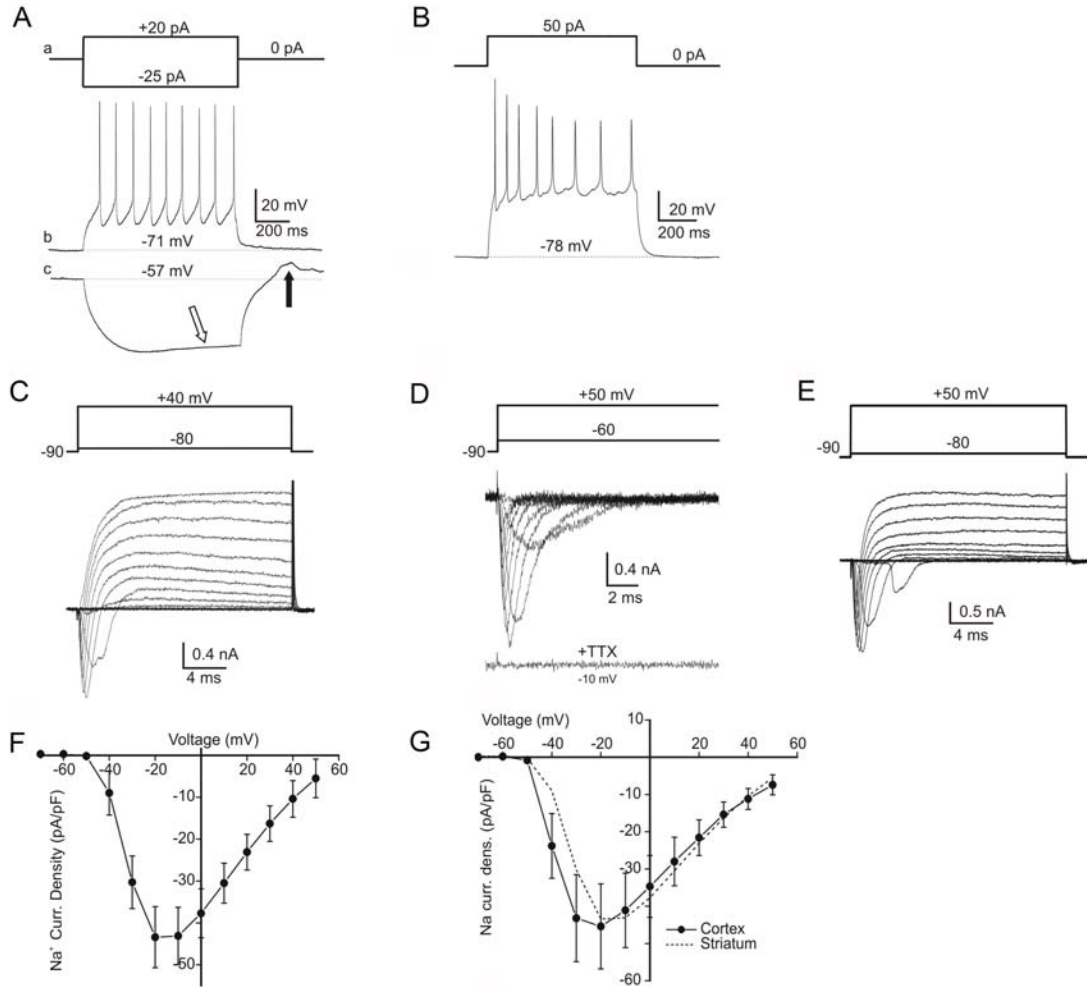


Figura 82. A-B: tracce di potenziale registrate in *current-clamp* da un neurone primario striatale (A) e corticale (B) in seguito all'applicazione di gradini di corrente positiva e negativa secondo il protocollo indicato sopra. C, E: Esempi di tracce di corrente positive (uscenti) e negative (entranti) registrate in un neurone primario striatale (C) e corticale (E) in seguito all'iniezione di gradini di potenziale (da -80 a +50 mV), partendo da un potenziale di membrana di -90 mV (Vh). La presenza di queste correnti suggerisce l'espressione di canali ionici di sodio e potassio funzionali in entrambi i tipi neuronali. D: Esempi di tracce di corrente mediata esclusivamente da canali al sodio registrate in *voltage-clamp* in un neurone primario striatale secondo il protocollo indicato. La traccia inferiore mostra l'abolizione della corrente in seguito all'applicazione di TTX. F,G: Grafici rappresentanti la relazione densità di corrente di Na<sup>+</sup>/voltage per le cellule primarie striatali (n=6) (F, G linea continua) e corticali (n=9) (G, linea tratteggiata). La densità di corrente è stata ottenuta dal rapporto tra l'ampiezza della corrente al picco per ogni valore di potenziale di membrana e la relativa capacità di membrana della cellula.

Inoltre, i neuroni primari striatali umani analizzati esprimono canali al  $\text{Ca}^{2+}$  sia ad alta che a bassa soglia (detti HVA e LVA, rispettivamente) (Figura 83A). Un risultato importante è emerso dalla comparazione delle curve densità di corrente/voltaggio nei due tipi di neuroni (Figura 83B-C), che ha evidenziato una differenza significativa nell'ampiezza media della densità di corrente nelle cellule primarie striatali rispetto alle corticali al potenziale di 0 mV ( $-7.8 \pm 2.5$  pA/pF,  $n=11$  and  $-3.9 \pm 1.1$  pA/pF,  $n=3$ , rispettivamente;  $p < 0.05$ ), ma non a -40 mV ( $-1.9 \pm 0.4$  pA/pF,  $n=11$  and  $-1.5 \pm 0.5$  pA/pF,  $n=3$ , rispettivamente). Questo suggerisce una maggiore espressione di canali HVA nei neuroni primari striatali.

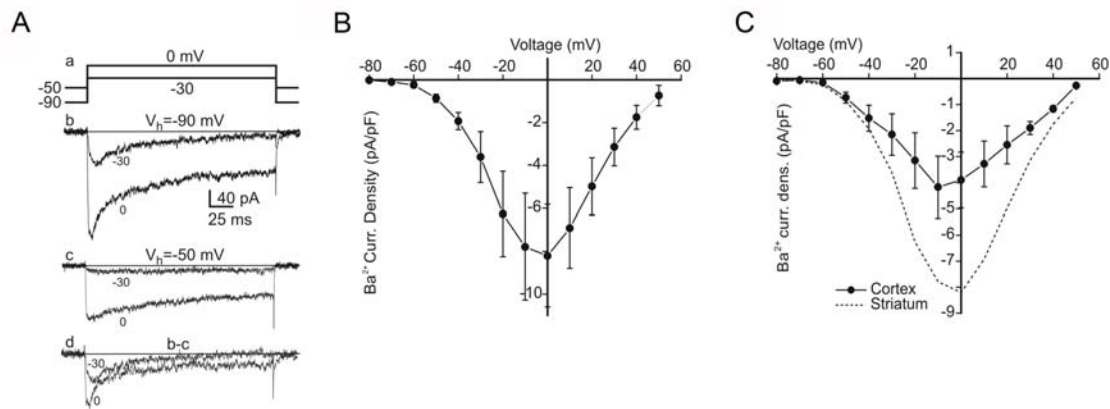


Figura 83. A: Tracce di corrente registrate in un neurone primario striatale evocate a potenziali test indicati nel protocollo sopra partendo da un potenziale iniziale ( $V_h$ ) di -90 mV in (b) e di -50 mV in (c) per inattivare i canali LVA. La sottrazione tra le tracce in (b) e (c) restituisce la corrente LVA isolata (d). B, C: Grafici rappresentanti la relazione densità di corrente/voltaggio per i canali di  $\text{Ca}^{2+}$  voltaggio dipendenti per le cellule striatali ( $V_h = -90$  mV) (B, C linea continua) e corticali ( $V_h = -90$  mV) (C, linea tratteggiata).

I neuroni primari striatali esprimono inoltre canali al  $\text{K}^+$  con inattivazione veloce o lenta (Figura 84A traccia b), chiamati rispettivamente *delayed-rectifier* (Figura 84A, traccia c) e di tipo A ( $\text{K}_A$ ) (Figura 84B). I canali  $\text{K}_A$  giocano un ruolo fondamentale nella regolazione del *firing* e della latenza nella generazione del primo potenziale d'azione.

L'applicazione dell'antagonista selettivo 4-aminopiridina (4AP; 1mM) blocca in maniera reversibile la componente veloce di inattivazione delle correnti  $\text{K}^+$  (Figura 84C, traccia superiore) e determina, nella stessa cellula, una riduzione della latenza nella generazione del primo potenziale d'azione, quando la cellula viene opportunamente depolarizzata (Figura 84C, traccia inferiore).



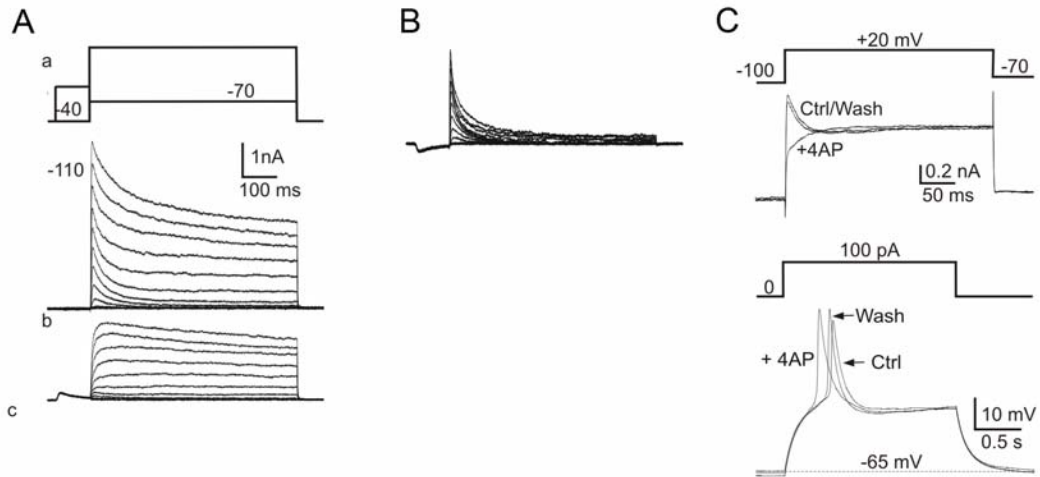


Figura 84. A: Esempi di tracce di correnti di potassio mediate dai canali di tipo A ( $K_A$ ) ottenute per sottrazione tra le tracce di corrente (b) registrate partendo da un potenziale di membrana ( $V_h$ ) di -100 mV e quelle registrate a diversi potenziali tra -70 a +40 mV, partendo da un potenziale di condizionamento di -40 mV per inattivare la corrente  $K_A$  (c). B: Per la stessa cellula in A, sottraendo le tracce in b e quelle in c si ottiene la corrente  $K_A$  isolata. C: Effetto dell'applicazione di 4AP, bloccante selettivo per la corrente  $K_A$ . Nella parte superiore sono mostrate le tracce di corrente registrate a +20 mV in un neurone striatale prima (ctrl), durante (+4AP) e dopo il lavaggio di 4AP; nella traccia inferiore sono mostrate le tracce di potenziale nelle medesime tre condizioni quando il potenziale di membrana è portato a soglia grazie all'iniezione di gradino di corrente positiva. In quest'ultimo caso, si noti come durante l'applicazione di 4AP il ritardo nella generazione del primo spike sia ridotto rispetto alla situazione di controllo.

In seguito è stata verificata la presenza di canali ligando-dipendenti funzionali, come suggerito dall'arricchimento nella subunità A del recettore del GABA. In esperimenti di *voltage-clamp* il 95% (19/20) dei neuroni primari striatali risponde all'applicazione di GABA (20  $\mu$ M) generando una corrente mediata dagli ioni cloro di  $-996 \pm 165$  pA. Inoltre nell'83% delle cellule (5/6) la co-applicazione di GABA e quinpirolo (10  $\mu$ M), un agonista selettivo del recettore dopaminergico di tipo D2, riduce in maniera significativa ( $49 \pm 12\%$ ) e parzialmente reversibile il picco di corrente evocato dalla sola applicazione di GABA, come noto dalla letteratura per un neurone MSN che esprime recettori dopaminergici funzionali (Neve et al., 2004; Delgado et al., 2000) (Figura 85A).

Le registrazioni effettuate al 30° giorno di differenziamento in *voltage-clamp* mostrano che i neuroni striatali primari a -70 mV generano correnti entranti in seguito all'applicazione di glutammato (50  $\mu$ M) ( $-79 \pm 43$  pA;  $n=6$ ) (Figura 85B, traccia superiore). Come atteso, negli esperimenti di *current-clamp*, l'applicazione di glutammato determina una depolarizzazione del potenziale di membrana che, spinto sopra-soglia, determina la generazione di un potenziale d'azione (Figura 85B, traccia inferiore).

Come suggerito dall'arricchimento nell'espressione delle subunità del recettore GABA<sub>A</sub> quali *GABRB1*, *GABRB3* and *GABRG2* GABA<sub>A</sub> nei campioni *in vitro* rispetto al tessuto *in vivo*, nel 100% dei neuroni primari corticali e in modo analogo con quanto visto prima nei neuroni striatali, l'applicazione di GABA determina l'insorgenza di correnti entranti e uscenti (Figura 85C). L'applicazione di AMPA (50  $\mu$ M) determina una corrente entrante nel 64% (9/14) dei neuroni primari corticali ( $-50 \pm 7$  pA) (Figura 85D, traccia superiore) che si traduce, in *current-clamp*, in una depolarizzazione del potenziale di membrana accompagnata dalla generazione di un *burst* di potenziali d'azione (Figura 85D traccia inferiore)

Infine, correnti post-sinaptiche spontanee inibitorie (sPSC), ovvero GABAergiche, sono state registrate in tutti i neuroni striatali primari (4/4), suggerendo che *in vitro* queste cellule ricevono contatti sinaptici dai neuroni di proiezione circostanti, come ci si aspetta da un neurone di proiezione striatale (Figura 85E, traccia superiore).

La co-coltura di cellule striatali-GFP e corticali-red tomato ha permesso di ricostruire ed analizzare *in vitro* il circuito cortico-striatale. Esclusivamente in queste condizioni siamo stati in grado di registrare anche sPSC eccitatorie, ovvero glutammatergiche, nel 33% dei neuroni primari striatali (2/6) (Figura 85E, traccia inferiore). Lo stesso profilo si osserva nel 14% (9/64) dei neuroni primari corticali in condizioni di mono-coltura (Figura 85F).

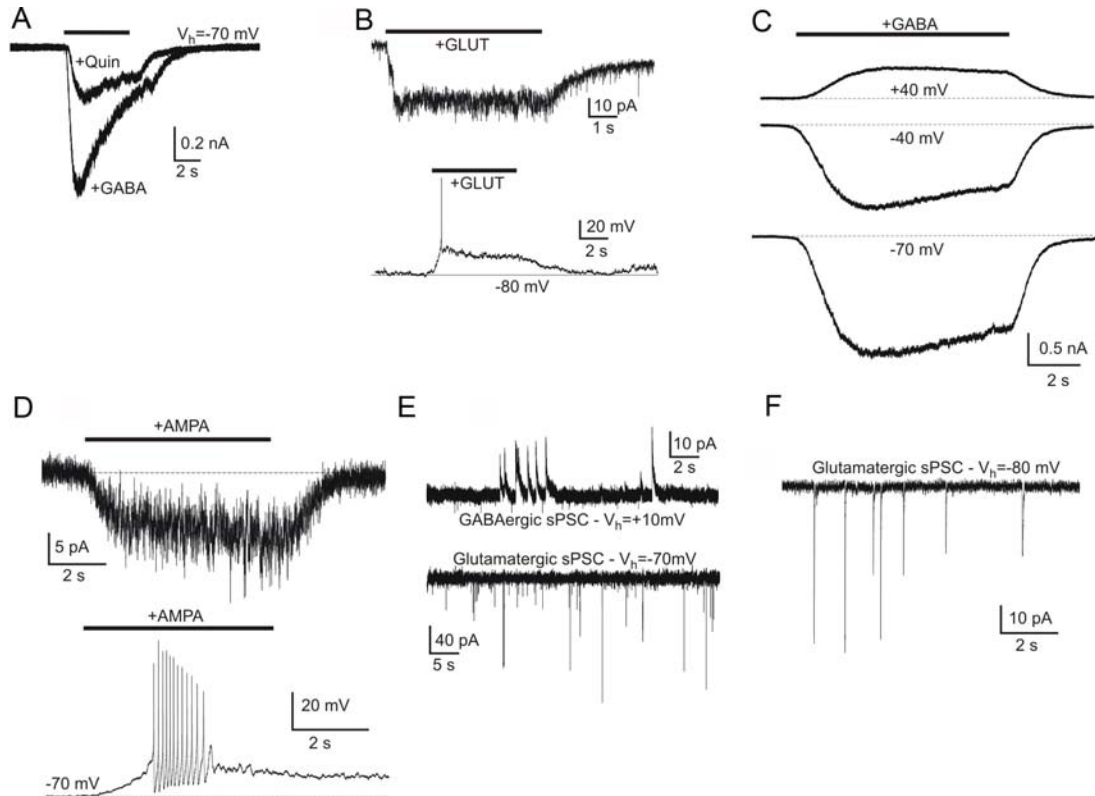


Figura 85. A: Tracce di corrente rappresentative dell'effetto della co-applicazione di GABA e quinpirolo (+quin) sulla corrente evocata esclusivamente da GABA (+GABA) in un neurone primario striatale registrato in *voltage-clamp* mantenendo il potenziale di membrana a -70 mV ( $V_h$ ). B: la traccia superiore rappresenta la corrente negativa (entrante) generata dall'applicazione di glutammato in un neurone primario striatale registrato in *voltage-clamp* a -70 mV. La stessa cellula, registrata in *current clamp* nelle medesime condizioni (traccia inferiore), presenta una depolarizzazione che guida il potenziale di membrana verso il raggiungimento della soglia e la generazione di un potenziale d'azione. C: Tracce di corrente che rappresentano l'effetto dell'applicazione di GABA in un neurone primario corticale a diversi valori di potenziale di membrana. Il verso delle correnti è in accordo con quanto previsto dalle condizioni ioniche in cui viene svolto l'esperimento (vedi Metodi). D: Analogamente a quanto descritto nel pannello B, esempi di tracce di corrente (sopra) e di potenziale (sotto) registrate in un neurone primario corticale in seguito all'applicazione di AMPA. E: tracce di corrente registrate in un neurone primario striatale a +10 e -70 mV. Le inflessioni positive e negative delle tracce sono identificate come eventi sinaptici spontanei (sPSC) inibitori (GABAergici) o eccitatori (glutamatergici), rispettivamente. F: traccia rappresentativa di sPSC eccitatori registrati in *voltage-clamp* a -80 mV in un neurone primario corticale.

Nell'intera figura, la barra orizzontale indica la durata temporale dell'applicazione delle sostanze.

## **DISCUSSIONE & CONCLUSIONI**

## 1. L'analisi di espressione genica globale definisce lo striato e la corteccia umani durante lo sviluppo embrionale e fetale

L'analisi di bioinformatica effettuata in questo lavoro di tesi ha permesso di ottenere una descrizione globale dell'organizzazione del trascrittoma del telencefalo umano nel periodo compreso tra la 6<sup>a</sup> e l'11<sup>a</sup> settimana di sviluppo. Sono state impiegate metodiche differenti allo scopo di investigare a diversi livelli il profilo di espressione che distingue lo striato dalla corteccia in sviluppo.

L'analisi di *class comparison* ha permesso di identificare 1306 geni differenzialmente espressi che distinguono inequivocabilmente lo striato dalla corteccia.

I geni identificati comprendono sia marcatori striatali e corticali noti (*ASCL1*, *DLXs*, *LHXs*, *GSX2*, *EMXs*, *PAX6*, *TBR2*, *FEZF2*), il cui ruolo è stato in passato investigato nei roditori e nell'uomo, sia nuovi marcatori diagnostici dell'identità striatale non descritti in precedenza (*NKX2-1*, *ZFH3*). Di particolare interesse è l'identificazione di RNA non codificanti arricchiti sia in striato sia in corteccia.

La *signature* trascrizionale che identifica e distingue ciascuna area telencefalica (striato o corteccia) è stata confermata dai risultati dell'analisi di *class discovery*. Questo tipo di analisi *unbiased* permette di identificare geni che possiedono livelli di espressione diversi tra gruppi di campioni senza fare riferimento ad alcun tipo di classificazione precedente dei campioni, come al contrario accade nelle analisi di *class comparison*. Tutti i geni bimodali sono compresi tra i geni differenzialmente espressi, a riprova della bontà dell'analisi. Sono stati identificati 92 geni con un andamento bimodale associato al tessuto d'origine. In particolare 51 BEG sono espressi in striato, mentre 41 in corteccia.

Entrambi gli approcci convergono nell'identificazione dei geni che definiscono l'identità striatale o corticale nell'uomo nel periodo di sviluppo investigato (6-11 settimane).

L'analisi di correlazione dell'espressione genica (WGCNA) ha identificato 15 moduli di geni co-espressi che descrivono l'organizzazione funzionale del trascrittoma nella finestra temporale investigata. Tra questi, i moduli M2 e M7 sono correlati con il tessuto d'origine, e contengono al loro interno sia geni differenzialmente espressi che bimodali. In particolare gli *hub genes* di ciascun modulo corrispondono ai geni bimodali. L'analisi di *gene ontology* dei geni correlati allo striato dimostra un arricchimento di geni coinvolti nelle vie del segnale del GABA e di DARPP-32 a dimostrazione dell'acquisizione del fenotipo DARPP-32<sup>+</sup> GABAergico dei neuroni striatali.



## 2. Definizione della mappa molecolare che descrive lo sviluppo embrionale e fetale del telencefalo nell'uomo

L'analisi trascrizionale ha evidenziato l'espressione di numerosi geni coinvolti con il *patterning*, l'organizzazione e il differenziamento dello striato durante lo sviluppo fetale nell'uomo. Le analisi di immunoistochimica hanno permesso di definire *in vivo* il *pattern* di espressione spazio-temporale di numerosi geni identificati *in silico*, descrivendo, per la prima volta, l'organizzazione del tubo neurale e del telencefalo, prima, e la maturazione dello striato poi nell'uomo.

Lo studio dell'espressione di fattori di trascrizione striato-arricchiti è iniziato in campioni embrionali estremamente precoci, in cui sta avendo luogo la chiusura delle pliche neurali. A questo stadio il neuroectoderma esprime OTX2, PAX6 e NKX2-1, senza che siano visibili *pattern* d'espressione associati a un commitment antero-posteriore o dorso-ventrale. L'espressione di NKX2-1 nell'ectoderma delle pliche neurali in chiusura è in accordo con quanto osservato nella piastra neurale anteriore nel topo (Shimamura and Rubenstein, 1997).

Durante la 3<sup>a</sup> settimana di sviluppo, il tubo neurale formatosi presenta già un'espressione complementare dominio-specifica di PAX6 e NKX2-1 nel tubo neurale dorsale e ventrale rispettivamente, in seguito al *patterning* dorso-ventrale operato da SHH e BMPs. Di particolare rilevanza è l'assenza di cellule GSX2<sup>+</sup>. Questo profilo di espressione suggerisce, anche nell'uomo, un ruolo molto precoce di NKX2-1 nella ventralizzazione del tubo neurale, prima ancora che GSX2 sia espresso come descritto nel topo (Corbin et al., 2003). Il profilo di espressione dorso-ventrale di PAX6 e NKX2-1 è mantenuto anche al termine dello sviluppo embrionale (7 settimane). A questo stadio GSX2 è ampiamente espresso nel telencefalo ventrale, definendo, insieme a PAX6 il confine tra pallio e subpallio.

Questo profilo di espressione è mantenuto anche durante lo sviluppo fetale in cui il PSB è definito, oltre che da PAX6 e GSX2, anche dall'espressione mutualmente esclusiva di TBR2, a livello dorsale, e ASCL1 e SP8, a livello ventrale.

FOXG1, al contrario degli altri fattori di trascrizione analizzati, inizia a essere espresso a partire da 3w+3d, fornendo la prima indicazione del *patterning* antero-posteriore del tubo neurale nell'uomo.

Questo studio d'immunoistochimica dimostra l'importanza dell'espressione di specifici fattori di trascrizione nella definizione dei confini molecolari tra strutture differenti. Sulla base di questa osservazione, l'analisi dell'espressione sito-specifica è stata utilizzata come metodo per la definizione, all'interno della stessa regione, dei domini in cui risiedono precursori, progenitori e neuroni maturi.

Spostandosi dal lume, la zona ventricolare, subventricolare e il mantello della LGE sono definiti dalla co-espressione di diversi fattori di trascrizione.

I progenitori della zona ventricolare esprimono FOXG1, OTX2, GSX2 e ASCL1.

Cellule ASCL1<sup>+</sup>, in particolare, si accumulano al confine tra la zona ventricolare e subventricolare, demarcando in questo modo le due regioni proliferative della LGE.

La zona subventricolare, oltre ad esprimere ASCL1, è positiva per ISL1 e EBF1.

Il mantello della LGE, dove risiedono i neuroni post-mitotici, è identificato dall'espressione di ISL1, EBF1, FOXP1, FOXP2, CTIP2, NKX2-1, DARPP-32.

Il differenziamento striatale è, quindi, conseguenza di una modificazione del *pattern* d'espressione genica che permette di acquisire diverse identità nel tempo. In particolare il differenziamento da progenitore neuroepiteliale a precursore striatale è accompagnato dalla down-regolazione di FOXP1, OTX2 e GSX2, e dalla parallela espressione di ISL1 e EBF1. In seguito il differenziamento verso neurone striatale richiede la completa down-regolazione di ASCL1 e l'espressione di FOXP1, FOXP2, CTIP2, NKX2-1, DARPP-32, oltre che al mantenimento di ISL1 e EBF1.

La co-espressione di CTIP2 e DARPP-32 è il tratto distintivo dei neuroni striatali spinosi medi. Il numero di cellule esprimenti DARPP-32 subisce un significativo incremento tra l'8<sup>a</sup> e l'11<sup>a</sup> settimana a testimonianza di un differenziamento dei neuroni striatali del mantello parallelamente ad una maturazione dello striato con il procedere dello sviluppo.

A 20 settimane i cambiamenti anatomici sono accompagnati da modificazioni del profilo di espressione in alcuni dei fattori di trascrizione studiati, a sottolineare la dinamicità del processo di sviluppo e differenziamento dello striato.

L'espressione di ISL1 e EBF1 è presente solamente nel caudato e putamen, in seguito ad una repressione della loro espressione nei progenitori striatali della zona subventricolare che, al contrario, continuano ad esprimere ASCL1. L'accumulo di progenitori e precursori ASCL1<sup>+</sup> tra la zona ventricolare e subventricolare non è più visibile.

I neuroni striatali mantengono l'espressione di EBF1, FOXP1, CTIP2, IKZF1, DARPP-32, come a stadi di sviluppo più precoci, ma l'espressione di ISL1 e FOXP2 si restringe a un numero esiguo di cellule. In particolare le cellule ISL1 non co-esprimono FOXP1, FOXP2 o CTIP2 suggerendo l'acquisizione di un fenotipo interneuronale e mostrando un profilo di espressione simile a quello descritto nel topo in cui ISL1 è espresso inizialmente in tutti i neuroni striatali per poi ridurre la propria espressione nei neuroni di proiezione striatali (Wang and Liu, 2001).

Un andamento simile è mostrato da FOXP2 che mantiene la propria espressione in poche cellule, le quali non esprimono CTIP2, ISL1 o EBF1.

A 20 settimane la totalità dei neuroni CTIP2<sup>+</sup> co-esprime GABA e DARPP-32 ad indicare un aumento del numero di neuroni striatali di proiezione maturi.

L'insieme dei profili di espressione e co-espressione ha reso possibile tracciare una mappa che descrive l'esatta posizione di ciascun fattore di trascrizione ai diversi stadi di sviluppo fetale investigati. In parallelo quest'analisi sistematica ha permesso di tracciare il profilo di acquisizione nel tempo dei diversi fattori di trascrizione e

marcatori citoplasmatici durante il processo di differenziamento e maturazione neurale dei neuroni striatali.

La mappa ottenuta differisce, per alcuni aspetti, dal profilo striatale descritto nel topo e nel ratto. *Nkx2-1*, nel topo è espresso in diverse aree del telencefalo ventrale comprese l'area pre-ottica, parte del setto e l'intera MGE, dalla zona ventricolare al mantello, mentre è totalmente assente dalla LGE ad eccezione degli interneuroni striatali originatisi nella MGE (Nobrega-Pereira et al., 2010; Sussel et al., 1999).

La presenza di *NKX2-1* nelle liste di geni differenzialmente espressi e bimodali arricchiti in striato, e la sua espressione nei neuroni striatali *ISL1*<sup>+</sup> e *CTIP2*<sup>+</sup> a 8 e 11 settimane di sviluppo rappresentano una delle differenze principali tra uomo e roditori che sono state identificate. I nostri dati di espressione genica sono supportati dai dati di trascrittomica presenti nell'Allen Atlas Brain relativi all'analisi di espressione di campioni a 8 e 9 settimane e dalle ibridazioni in situ effettuate su campioni a 15 e 21 settimane che mostrano la presenza di cellule *NKX2-1*<sup>+</sup> nello striato. L'espressione di *NKX2-1* nel cervello fetale umano durante lo sviluppo è stata studiata in precedenza. Diversi gruppi di ricerca hanno riportato l'espressione di *NKX2-1* nelle eminenze ganglionari, tra la 5<sup>a</sup> e la 25<sup>a</sup> settimana di sviluppo, ma *NKX-1* è stato sempre considerato come marcatore di cellule originate nella MGE (Rakic and Zecevic, 2003; Ma et al., 2013; Hansen et al., 2013), e la sua espressione non è mai stata investigata in associazione ad altri fattori di trascrizione striatali. Il lavoro di Fertuzinhos *et al.*, 2009 descrive l'espressione di *NKX2-1* nello striato in campioni di 18 settimane e oltre, descrivendolo come marcatore di interneuroni striatali.

Il profilo di co-espressione studiato in questa tesi è in accordo con quando osservato nei nostri campioni a 20 settimane in cui si verifica una forte riduzione del numero di cellule *NKX2-1*<sup>+</sup>, alcune delle quali continuano a co-esprimere *CTIP2*, escludendo la possibilità che nell'uomo *NKX2-1* sia espresso solo negli interneuroni originati nella MGE.

Il profilo di espressione di *NKX2-1* che abbiamo descritto potrebbe far pensare ad un suo ruolo temporaneo nella specificazione dei neuroni striatali, in quanto è espresso solamente nel mantello e in una finestra temporale ridotta. A 20 settimane di sviluppo infatti la co-espressione *NKX2-1/CTIP2* si riduce ad un numero esiguo di cellule e la quasi totalità delle cellule *NKX2-1* non esprime *ISL1*, come osservato a 8 settimane. In aggiunta l'entità dell'espressione di *NKX2-1* nel mantello della LGE rispetto alla MGE è notevolmente inferiore, suggerendo la presenza di due ben distinti livelli di espressione di questo fattore di trascrizione nelle due aree del telencefalo ventrale.

Un'altra peculiarità identificata dall'analisi di co-espressione *in vivo* è stata l'identificazione di neuroni corticali localizzati nella *cortical plate* *TBR1*<sup>+</sup>, *CTIP2*<sup>+</sup>, *DARPP-32*<sup>+</sup> e *GABA*<sup>-</sup> a 8 e 11 settimane di sviluppo. Quest'osservazione è in accordo con risultati descritti nel ratto che riportano l'espressione di *DARPP-32* nei neuroni dopaminocettivi dello strato VI della corteccia (Hisaoka et al., 2010; Rajput et al., 2009). Nell'uomo gli unici dati presenti in letteratura fanno riferimento ad analisi d'immunoistochimica effettuate su cervelli post-mortem di pazienti adulti affetti da

schizofrenia o disturbi bipolari, che hanno dimostrato una riduzione del numero di neuroni DARPP-32<sup>+</sup> negli strati II, III, IV e V della corteccia (Kunii et al., 2011; Zhan et al., 2011; Hishikawa et al., 2007). Le nostre osservazioni riportano per la prima volta l'espressione di DARPP-32 nei neuroni corticali durante lo sviluppo fetale umano.

Con il procedere dello sviluppo numerosi marcatori striatali iniziano ad essere espressi in specifiche popolazioni di neuroni corticali, caratterizzate da una precisa localizzazione nella *cortical plate*. A 20 settimane CTIP2, FOXP1, FOXP2, NKX2-1, GABA, DARPP-32, CALB e CR sono espressi nella corteccia in sviluppo con un profilo di co-espressione differente da quello osservato in striato. Questo ci permette di distinguere, sulla base del set di marcatori co-espressi, i neuroni striatali da quelli corticali. Di particolare rilevanza è la mancata co-espressione di CTIP2 con FOXP1, FOXP2, GABA e, ad eccezione di rare cellule, DARPP-32. Inoltre i neuroni corticali DARPP-32<sup>+</sup> non esprimono GABA. Questo profilo di espressione distingue in maniera inequivocabile i neuroni DARPP-32<sup>+</sup> striatali e corticali.



### 3. Definizione trascrizionale e molecolare di neuroni primari striatali e corticali

La disponibilità di tessuto fresco da cui derivare progenitori e precursori striatali e corticali per il differenziamento ci ha permesso di studiarne *in vitro* il *commitment* neuronale e le proprietà elettrofisiologiche dei neuroni striatali e corticali, e ci ha offerto la possibilità di caratterizzarne il profilo trascrizionale e di confrontarlo con quello *in vivo*.

I progenitori neurali primari isolati e coltivati *in vitro* esprimono fattori di trascrizione regione-specifici e sono in grado di differenziare efficientemente a neuroni striatali e corticali. La capacità di mantenere *in vitro* l'identità regionale è supportata dall'analisi di *unsupervised hierarchical clustering* che mostra come i profili trascrizionali *in vivo* ed *in vitro* siano raggruppati nello stesso ramo del dendrogramma. Inoltre l'analisi dei geni differenzialmente espressi tra il tessuto a 8 settimane di sviluppo e i neuroni primari, derivati da un tessuto della stessa età, differenziati per 30 giorni ha dimostrato una maturazione funzionale dei neuroni *in vitro*, evidenziata da un arricchimento di geni codificanti per canali ionici e recettori. Le analisi elettrofisiologiche hanno confermato i dati trascrizionali e dimostrato la capacità dei neuroni primari di generare potenziali d'azione ripetitivi e potenziali d'azione post-sinaptici spontanei, di possedere canali al  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  e  $\text{Ca}^{2+}$  e recettori per il GABA e la dopamina funzionali. Questi risultati dimostrano come le colture primarie possono rappresentare lo *standard* di riferimento per lo sviluppo di protocolli di differenziamento *in vitro* di neuroni striatali a partire da cellule staminali pluripotenti.

Questo lavoro di tesi rappresenta il primo tentativo di definire da un punto di vista trascrizionale e molecolare l'anatomia e lo sviluppo dello striato durante lo sviluppo embrionale e fetale umano. L'analisi del profilo di espressione differenziale tra striato e corteccia ha permesso di identificare geni regione-specifici che intervengono nella definizione di ciascuna delle due componenti telencefaliche. Questa strategia, combinata con lo studio di espressione proteica a partire dalle primissime fasi di formazione del tubo neurale, ha reso possibile descrivere le dinamiche alla base della specificazione del telencefalo e della successiva generazione e maturazione dello striato. Infine la caratterizzazione funzionale dei neuroni striatali e corticali differenziati in vitro ha fornito nuove informazioni sulle proprietà elettrofisiologiche dei neuroni umani.

## **MATERIALI & METODI**

### **Tessuti Umani.**

I feti umani derivano da pazienti richiedenti l'interruzione di gravidanza. Tutte le procedure sono state approvate dal Comitato Etico dell'Università degli Studi di Milano e di Cambridge, in seguito alla piena approvazione etica nel Regno Unito in accordo con le guide linea del Polkinghorne Report e del Dipartimento delle Salute.

Alcuni campioni sono stati ottenuti dall'Ospedale San Paolo di Milano. I tessuti sono stati collezionati con il consenso della paziente e l'approvazione dei Comitati Etici ed Istituzionali dell'Università degli Studi di Milano e dell'Ospedale San Paolo.

### **Definizione dei periodi di sviluppo umano**

Lo sviluppo umano è un processo molto dinamico. La stadiazione dello sviluppo del sistema nervoso umano è stato precedentemente descritto ed in questo lavoro noi faremo riferimento a questa elaborazione (O'Rahilly, R. & Müller, F. Sidman, R. L. & Rakic, 1 P. Sidman 1973, R. L. & Rakic 1982, P. Altman & Bayer, Kang 2011).

L'utilizzo delle settimane post-concezionali (w), come metodo di stadiazione, include entrambi i termini propriamente utilizzati correntemente in letteratura per indicare l'età di sviluppo dell'embrione umano, che può essere considerata anche come età post-ovulatoria o post-fertilizzazione.

In accordo con il lavoro pubblicato nel 2011 dal gruppo del Professor Sestan, faremo riferimento ai seguenti periodi di sviluppo per descrivere i campioni utilizzati nel nostro studio:

Sviluppo embrionale: 2-8 settimane;

Sviluppo fetale precoce: 8-13 settimane;

Sviluppo fetale intermedio precoce: 13-19 settimane;

Sviluppo fetale intermedio tardivo: 19-24 settimane.

### **Collezione dei Tessuti**

Questo studio è stato condotto utilizzando campioni *post-mortem* di cervello della collezione di tessuti dell'Istituto di Ricerca Medica dell'Università di Cambridge, e dell'Ospedale San Paolo di Milano. I campioni di tessuto fetale coprono un intervallo di sviluppo compreso tra le 2w+5d e le 20w. L'età embrionale e fetale dei campioni è stata determinata sulla base della data dell'ultima mestruazione della madre, della lunghezza dalla testa al fondo schiena (CRL) e di un'analisi visiva dei campioni. In base alle condizioni ed alle età dei campioni collezionati sono stati adottati 3 diversi metodi di dissezione. La tabella fornisce la lista di tutti i campioni di tessuto utilizzati per questo studio. Entrambi gli emisferi, destro e sinistro, delle regioni d'interesse sono stati collezionati da tessuti freschi.

#### **i) Campioni per estrazione di RNA**

Durante la dissezione il tronco cerebrale ed il cervelletto sono stati rimossi tramite un taglio trasversale alla giunzione tra diencefalo e mesencefalo. In seguito il cervello è stato suddiviso nei due emisferi attraverso un taglio lungo la linea mediana. LGE/striato e corteccia sono stati dissezionati con un bisturi e immediatamente messi

in buffer RLT (Qiagen) e congelati in ghiaccio secco. I campioni sono stati conservati a -80°C per la successiva estrazione di RNA.

## **ii) Campioni per immunohistochimica**

I cervelli sono stati conservati in ghiaccio durante la dissezione. Tutti i campioni sono stati fissati in formaldeide 4% a 4°C per 1-4 giorni secondo la dimensione del campione. In seguito i campioni sono stati crioprotetti in saccarosio 30%, inclusi in tissue-tek, conservati a -80°C e poi sezionati al criostato (12-30 µm). Le sezioni sono state conservate a -80°C. Per i campioni di età compresa tra 2w e 4w l'intero embrione è stato incluso. Per i campioni di età superiore a 4w, quando possibile, il cervello è stato rimosso ed incluso.

## **iii) Campioni per derivazione di neuroni primari**

I cervelli sono stati conservati in ghiaccio durante la dissezione. Il tronco cerebrale ed il cervelletto sono stati rimossi tramite un taglio trasversale alla giunzione tra diencefalo e mesencefalo. In seguito il cervello è stato suddiviso nei due emisferi attraverso un taglio lungo la linea mediana. LGE/striato e corteccia sono stati dissezionati con un bisturi ed immediatamente messi in hibernate-E medium (Life Technologies) e conservato a 4°C per la spedizione ed il processamento.

## **Estrazione dell'RNA e sintesi del cRNA**

L'RNA totale è stato estratto da campioni fetali di LGE/striato e corteccia oppure da neuroni primari striatali e corticali differenziati *in vitro* per 30 giorni (Tabella 1) utilizzando RNeasy Mini Kit (Qiagen), secondo le istruzioni del produttore. La concentrazione di RNA è stata determinata con il Nanodrop (ThermoScientific) e la purezza dell'RNA è stata valutata sulla base del rapporto  $A_{260}/A_{280}$ . Solamente campioni con un rapporto  $A_{260}/A_{280}$  superiore a 1.9 sono stati utilizzati. 500ng di RNA per ciascun campione sono stati utilizzati per la sintesi del cRNA utilizzando il kit Illumina TotalPrep RNA Amplification (Ambion); 750ng di cRNA marcato sono stati ibridati sul chip Illumina HumanHT-12 v4 arrays (Illumina).

## **Analisi di microarray**

I dati trascrizionali grezzi del chip Illumina HumanHT-12 v4 arrays (Illumina) sono stati normalizzati ed esportati utilizzando il software Genome Studio GX (Illumina Inc). Le sonde con un p-value di detezione <0.05 in almeno 5 dei 26 campioni (12 coppie di campioni di striato (ST) e corteccia (CX) e due singoli campioni di ST) sono state considerate come espresse. Non sono stati identificati campioni *outlier* nell'analisi della componente principale (PCA) e nell'analisi di *hierarchical clustering*. Per la determinazione dei geni differenzialmente espressi (DEG) tra le 12 coppie di campioni di ST e CX è stato effettuato un paired t-test con il pacchetto MeV package (Saeed et al., 2006), con il criterio del *false discovery rate* (FDR) ed un cambiamento nei livelli di espressione di  $\pm 1.7$ . Un *unsupervised clustering analysis* (Pearson's correlation) ha rilevato due distinti gruppi di campioni comprendenti ST e CX rispettivamente. L'analisi ha identificato anche un gruppo separato di 4 campioni con un'espressione mista (una coppia di ST e CX e due campioni singoli di ST e CX). La



rimozione delle relative 3 coppie di campioni dall'analisi di clustering ha incrementato del 30% il numero dei DEG identificati, risultanti in 1306 DEG.

3 campioni di neuroni primari striatali (hPNs) striatali e 3 campioni corticali sono stati misurati ed aggiunti al dataset dei campioni di tessuto. Dopo l'operazione di filtraggio dei dati, 28700 sonde sono state considerate come espresse ( $p < 0,05$  in almeno 3 campioni). L'analisi dei geni differenzialmente espressi è stata effettuata tra i campioni *in vitro* di ST e CX hPNs e i 5 campioni di tessuto di ST e CX a 8w utilizzando un paired t-test con il pacchetto MeV package (Saed et al., 2006), con il criterio del FDR ed un cambiamento nei livelli di espressione di  $\pm 1.7$ .

### **Immunofluorescenza**

Le cellule sono state fissate in formaldeide al 4% per 15 minuti a temperatura ambiente, permeabilizzate 10 minuti con PBS-Triton X-100 allo 0.5% per 15 minuti e bloccate con siero fetale bovino (FBS) al 5% per un ora. Le sezioni di cervello sono state reidratate per 10 minuti in PBS, permeabilizzate 15 minuti con PBS-Triton X-100 allo 0.5% e bloccate con siero fetale bovino (FBS) al 10% per un'ora. Le cellule o le sezioni di cervello sono state incubate 3 ore a temperatura ambiente oppure tutta notte a 4°C con l'anticorpo primario alla opportuna diluizione. Anticorpi secondari coniugati con fluorofori Alexa 488 o 568 (Life Technologies) sono stati diluiti 1:500 e Hoechst 1:10000 (5 µg/ml; Molecular Probes, Life Technologies) per marcare i nuclei. Le sezioni sono state montate con fluorescent mounting medium (Dako). Tutti gli anticorpi utilizzati sono elencati nella tabella 5. Le immagini sono state acquisite con microscopi Leica DMI 6000B and DM4000B (Leica Microsystem), analizzate con i software LAS-AF imaging software e processate con Adobe Photoshop. Immagini confocali sono state acquisite con il microscopio Leica TCS SP2 (Leica Microsystem) e processate con Adobe Photoshop.

<b>Antibody</b>	<b>Comapny</b>	<b>Code</b>	<b>Species</b>
ASCL1	BD	556604	MOUSE IgG
B catenin	Cell Signalling	9562	RABBIT
B3 tubulin	Promega	T8660	MOUSE IgG
B3 tubulin	Covance	PRB-435P	RABBIT
CALBINDIN	SWANT	CB-38A	RABBIT
CALRETININ	BD	610908	MOUSE IgG
CTIP2	Abcam	ab18465	RAT
DARPP-32	Abcam	ab40801	RABBIT
DARPP-32	Santa Cruz	sc271111	MOUSE IgG
EBF1	Santa Cruz	sc-137065	MOUSE IgG
FOXG1	StemCulture	NCFAB	RABBIT
FOXP1	Abcam	ab16645	RABBIT
FOXP2	Abcam	ab16046	RABBIT
GABA	Sigma	A2052	RABBIT
GAD65/67	Millipore	AB1511	RABBIT
GSX2	Millipore	ABN162	RABBIT
GSX2	Campbell (gift)		RABBIT
Ikaros	Santa Cruz	SC-13039	RABBIT
Islet-1		39.4D5	MOUSE IgG
Ki67	Abcam	ab15580	RABBIT
Ki67	BD	556003	MOUSE IgG
MAP2	BD	556320	MOUSE IgG
MAP2	Sigma	M1406	MOUSE IgG
N-cadherin	BD	610921	MOUSE IgG
Nestin	Millipore	AB5922	RABBIT
Nestin	R&D	PRB-315C	MOUSE IgG
NKX2-1	Abcam	Ab76013	RABBIT
NPY	Immunostar	22940	RABBIT
OTX2	Millipore	AB9566	RABBIT
PAX6	Covance	PRB-278P	RABBIT
PAX6	DSHB	PAX6	MOUSE IgG
PH3	Cell Signalling	9106	MOUSE IgG
SATB2	Abcam	ab51502	MOUSE IgG
SOX2	Millipore	AB5603	RABBIT
SP8	Santa Cruz	SC-104661	GOAT
SST	Millipore	MAB354	RAT
TBR1	Abcam	ab31940	RABBIT
TBR2	Abcam	ab23345	RABBIT
TH	Immunological Science	AB10312	RABBIT
V-GLUT1	SySy	135511	GIUNEA PIG
Vimentin	DSHB	40E-C	MOUSE IgG

Tabella 5. Elenco degli anticorpi primari utilizzati per le analisi

### **Derivazione delle colture primarie e differenziamento neuronale**

Dopo dissezione il tessuto corticale o striatale è stato mantenuto in hibernate-E medium (Life Technologies) e piastrato entro 48 ore dell'intervento di interruzione di gravidanza. Il tessuto è stato frammentato meccanicamente in piccoli pezzi allo stereomicroscopio e poi dissociato in PBS freddo fino ad ottenere una sospensione di cellule singole. Per il differenziamento, i precursori striatali e corticali sono stati piastrati in condizioni di monostrato su poly-D-lysine (10µg/ml) / laminin (3µg/ml) ad una densità di 150000 cells/cm<sup>2</sup> and 75000 cells/cm<sup>2</sup> rispettivamente. Il medium di differenziamento è composto da DMEM/F12 (Gibco) contenente N2 1:100 (Gibco), B27 1:50 (Gibco), BDNF (30 ng/ml, R&D System), 1% Penicillin/Streptomycin (Euroclone) e 1% Gluta-MAX (Gibco). Nel caso dei precursori striatali il medium di differenziamento contiene B27 senza Vitamina A (Gibco). Per favorire la sopravvivenza cellulare dei precursori dopo la dissociazione al medium è aggiunto FGF-2 (10 ng/ml) per le prime 48 ore. Il medium è stato parzialmente sostituito ogni 3-4 giorni. Le cellule sono state differenziate per 3-5, 15 o 32 giorni a seconda del tipo di analisi.

### **Infezioni lentivirali per le co-colture striato-corteccia**

I progenitori striatali e corticali sono stati infettati con vettori lentivirali AAVS1-hPGK-GFP-pA o AAVS1-hPGK-Tomato-pA. I vettori lentivirali sono stati prodotti trasfettando le particelle lentivirali nelle cellule 293T e due giorni dopo la trasfezione il surnatante è stato filtrato e successivamente ultracentrifugato (19500 rpm, 2 hours, 4°C). Il pellet virale è stato risospeso in PBS (2 ore 4°C), aliquotato e conservato a -80°C. Il sistema di co-colture è stato generato infettando i precursori striatali e corticali immediatamente dopo la dissociazione con GFP e Tomato rispettivamente per 3 ore a 37°C. Al termine dell'incubazione i precursori sono stati centrifugati e lavati due volte in PBS per eliminare le particelle virali, risospesi in medium di differenziamento e piastrati in rapporto 1:1.

### **Registrazioni elettrofisiologiche**

Le cellule sono state visualizzate attraverso un microscopio invertito (Eclipse TE200, Nikon) dotato di due obiettivi (10 o 40 ingrandimenti). Le pipette sono state ricavate da sottili capillari di vetro borosilicato attraverso un *puller* (Sutter P-97; Sutter Instruments). Le registrazioni sono state eseguite con la tecnica del *patch-clamp* in configurazione di *whole-cell* sia in *voltage-clamp* che in *current-clamp*, usando un amplificatore (Axopatch 200B; Axon Instruments) e un convertitore analogico-digitale AD/DA (Digidata 1322A; Axon Instruments). I segnali sono stati filtrati a 10 KHz ed acquisiti a 10-50 KHz per mezzo di un *software* dedicato (Clampex; Axon Instruments). I transienti capacitivi veloci sono stati ridotti *on-line* e le correnti capacitive residue e quelle di *leak* sono state sottratte attraverso uno specifico protocollo, detto P/4. Le cellule sono state iniettate con biocitina, aggiunta alla soluzione intracellulare (3mg/ml), per apprezzarne la morfologia e processate dopo la registrazione con una reazione di immunofluorescenza (IF). Sono state utilizzate

diverse soluzioni intra- ed extracellulari a seconda del tipo di esperimento (vedi tabella). I valori del potenziale di membrana ( $V_m$ ) riportati nel testo sono stati corretti per il valore di *liquid junction* misurato tra la soluzione nel bagno e nella pipetta. La resistenza in serie della pipetta è stata monitorata costantemente durante la registrazione, ma non è stata utilizzata alcuna compensazione.

In configurazione di *voltage-clamp* abbiamo misurato le proprietà passive della membrana subito dopo il raggiungimento della configurazione di *whole-cell*. La resistenza di ingresso ( $R_{input}$ ,  $R_{in}$ ) è stata calcolata come rapporto tra il gradino di potenziale applicato (10 mV della durata di 180 ms) e la risposta in corrente misurata alla fine del transiente (media degli ultimi 5 ms). Utilizzando lo stesso protocollo, abbiamo calcolato la capacità di membrana ( $C_m$ ) sottraendo dall'integrale del transiente l'area determinata dalla corrente allo stato stazionario e dividendo per il gradino di potenziale applicato (10 mV).

Le correnti post-sinaptiche spontanee (sPSCs) sono state analizzate con *Clampfit* (Axon Instruments). Per la detezione, le tracce in corrente sono state sottratte alla *baseline* ed è stato identificato un evento sinaptico quando la media della corrente, calcolata su 300 ms attorno al picco del putativo evento, eccedeva di almeno due volte la deviazione standard della media del *noise* di base.

Quinpirole, SCH23390 e 2,3-Dioxo-6-nitro-1,2,3,4-tetrahydrobenzo[f]quinoxaline-7-sulfonamide disodium salt (NBQX) sono stati acquistati da Tocris Bioscience, la tetrodotossina (TTX) da Alomone Labs e tutte le altre sostanze chimiche da Sigma. Abbiamo preparato soluzioni stock in acqua, mantenute a  $-20^{\circ}\text{C}$ ; durante gli esperimenti le aliquote sono state diluite nella soluzione salina extracellulare ed applicate localmente attraverso un sistema di perfusione a multivita posizionato vicino al soma della cellula registrata.

I dati sono riportati come media  $\pm$  errore standard della media (s.e.m). Per i confronti statistici abbiamo utilizzato test non parametrici a due code calcolati con l'ausilio del *software* Microcal Origin.

La composizione delle soluzioni intracellulari ed extracellulari utilizzate per le registrazioni elettrofisiologiche per gli esperimenti di  $I_{Na}$ ,  $I_K$ ,  $I_{Ca}$ ,  $I_{GABA}$ , che sono state utilizzate per studiare rispettivamente le correnti  $Na^+$ ,  $K^+$ ,  $Ca^+$  and GABA, sono indicate in Tabella 6.  $I_{tot}$  è stata utilizzata per registrar famiglie di correnti in *voltage-clamp* e per eseguire registrazioni in *current-clamp*. Nelle soluzioni intracellulari utilizzate per le registrazioni delle correnti GABA è stata aggiunta lidocaina per evitare *unclamped spiking*.

<b>Current recorded</b>	<b>Intracellular solution (in mM)</b>	<b>Extracellular solution (in mM)</b>
$I_{tot}$ $I_{GLUT}$	K-gluconate (130), NaCl (4), $MgCl_2$ (2), EGTA (1), HEPES (10), CP (5), $Na_2ATP$ (2), $Na_3GTP$ (0.3) at pH 7.3 with KOH	NaCl (140), $MgCl_2$ (1), $CaCl_2$ (2), KCl (3), glucose (10), HEPES (10) at pH 7.4 with NaOH
$I_{Na+}$	CsCl (120), NaCl (10), TEA-Cl (20), EGTA (10), HEPES (10), $MgCl_2$ (2), Mg-ATP (4) at pH 7.35 with CsOH	NaCl (155), KCl (3), $MgCl_2$ (1), $CaCl_2$ (1), HEPES (10) at pH 7.35 with NaOH
$I_{K+}$	KCl (128), NaCl (10), $MgCl_2$ (2), $CaCl_2$ (1), EGTA (11), HEPES (20), Mg-ATP (4) at pH 7.25 with KOH	NaCl (155), KCl (3), $MgCl_2$ (1), $CaCl_2$ (1), HEPES (10), TTX (0.001) at pH 7.35 with NaOH
$I_{Ca^{2+}}$	CsCl (120), TEA-Cl (20), EGTA (10), HEPES (10), $MgCl_2$ (2), Mg-ATP (4) at pH 7.4 with CsOH	NaCl (130), Glucose (10), HEPES (10), 4-AP (1), TEA-Cl (10), $BaCl_2$ (10), $MgCl_2$ (2), Mg-ATP (4), TTX (0.001) at pH 7.4 with CsOH
$I_{GABA}$	CsCl (135), NaCl (3), $MgCl_2$ (1), EGTA (10), EGTA (10), $CaCl_2$ (0.5), $Na_2-ATP$ (4), $Na_3-GTP$ (0.3), lidocaine L-ethylbromide (5) at pH 7.2 with CsOH	Same as $I_{tot}$

Tabella 6. Elenco e composizione delle soluzioni intracellulari ed extracellulari impiegate per le registrazioni elettrofisiologiche.



## **BIBLIOGRAFIA**

- Anderson, S.A., Qiu, M., Bulfone, A., Eisenstat, D.D., Meneses, J., Pedersen, R., and Rubenstein, J.L. (1997). Mutations of the homeobox genes *Dlx-1* and *Dlx-2* disrupt the striatal subventricular zone and differentiation of late born striatal neurons. *Neuron* 19, 27-37.
- Arlotta, P., Molyneaux, B.J., Chen, J., Inoue, J., Kominami, R., and Macklis, J.D. (2005). Neuronal subtype-specific genes that control corticospinal motor neuron development in vivo. *Neuron* 45, 207-221.
- Arlotta, P., Molyneaux, B.J., Jabaudon, D., Yoshida, Y., and Macklis, J.D. (2008). *Ctip2* controls the differentiation of medium spiny neurons and the establishment of the cellular architecture of the striatum. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 28, 622-632.
- Bayatti, N., Moss, J.A., Sun, L., Ambrose, P., Ward, J.F., Lindsay, S., and Clowry, G.J. (2008a). A molecular neuroanatomical study of the developing human neocortex from 8 to 17 postconceptional weeks revealing the early differentiation of the subplate and subventricular zone. *Cerebral cortex* 18, 1536-1548.
- Bayatti, N., Sarma, S., Shaw, C., Eyre, J.A., Vouyiouklis, D.A., Lindsay, S., and Clowry, G.J. (2008b). Progressive loss of *PAX6*, *TBR2*, *NEUROD* and *TBR1* mRNA gradients correlates with translocation of *EMX2* to the cortical plate during human cortical development. *The European journal of neuroscience* 28, 1449-1456.
- Bedogni, F., Hodge, R.D., Elsen, G.E., Nelson, B.R., Daza, R.A., Beyer, R.P., Bammler, T.K., Rubenstein, J.L., and Hevner, R.F. (2010). *Tbr1* regulates regional and laminar identity of postmitotic neurons in developing neocortex. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107, 13129-13134.
- Bernacer, J., Corlett, P.R., Ramachandra, P., McFarlane, B., Turner, D.C., Clark, L., Robbins, T.W., Fletcher, P.C., and Murray, G.K. (2013). Methamphetamine-Induced Disruption of Frontostriatal Reward Learning Signals: Relation to Psychotic Symptoms. *The American journal of psychiatry*.
- Bracci, E., Centonze, D., Bernardi, G., and Calabresi, P. (2002). Dopamine excites fast-spiking interneurons in the striatum. *J Neurophysiol* 87, 2190-2194.
- Bystron, I., Blakemore, C., and Rakic, P. (2008). Development of the human cerebral cortex: Boulder Committee revisited. *Nature reviews Neuroscience* 9, 110-122.
- Campbell, K. (2003). Dorsal-ventral patterning in the mammalian telencephalon. *Current opinion in neurobiology* 13, 50-56.
- Caric, D., Gooday, D., Hill, R.E., McConnell, S.K., and Price, D.J. (1997). Determination of the migratory capacity of embryonic cortical cells lacking the transcription factor *Pax-6*. *Development* 124, 5087-5096.
- Casarosa, S., Fode, C., and Guillemot, F. (1999). *Mash1* regulates neurogenesis in the ventral telencephalon. *Development* 126, 525-534.

Colantuoni, C., Lipska, B.K., Ye, T., Hyde, T.M., Tao, R., Leek, J.T., Colantuoni, E.A., Elkahoul, A.G., Herman, M.M., Weinberger, D.R., *et al.* (2011). Temporal dynamics and genetic control of transcription in the human prefrontal cortex. *Nature* 478, 519-523

Corbin, J.G., Gaiano, N., Machold, R.P., Langston, A., and Fishell, G. (2000). The Gsh2 homeodomain gene controls multiple aspects of telencephalic development. *Development* 127, 5007-5020.

Corbin, J.G., Rutlin, M., Gaiano, N., and Fishell, G. (2003). Combinatorial function of the homeodomain proteins Nkx2.1 and Gsh2 in ventral telencephalic patterning. *Development* 130, 4895-4906.

Danesin, C., Peres, J.N., Johansson, M., Snowden, V., Cording, A., Papalopulu, N., and Houart, C. (2009). Integration of telencephalic Wnt and hedgehog signaling center activities by Foxg1. *Developmental cell* 16, 576-587.

Deacon, T.W., Pakzaban, P., and Isacson, O. (1994). The lateral ganglionic eminence is the origin of cells committed to striatal phenotypes: neural transplantation and developmental evidence. *Brain research* 668, 211-219.

Dickinson, M.E., Krumlauf, R., and McMahon, A.P. (1994). Evidence for a mitogenic effect of Wnt-1 in the developing mammalian central nervous system. *Development* 120, 1453-1471.

Dou, C., Lee, J., Liu, B., Liu, F., Massague, J., Xuan, S., and Lai, E. (2000). BF-1 interferes with transforming growth factor beta signaling by associating with Smad partners. *Molecular and cellular biology* 20, 6201-6211.

Echevarria, D., Vieira, C., Gimeno, L., and Martinez, S. (2003). Neuroepithelial secondary organizers and cell fate specification in the developing brain. *Brain research Brain research reviews* 43, 179-191.

Englund, C., Fink, A., Lau, C., Pham, D., Daza, R.A., Bulfone, A., Kowalczyk, T., and Hevner, R.F. (2005). Pax6, Tbr2, and Tbr1 are expressed sequentially by radial glia, intermediate progenitor cells, and postmitotic neurons in developing neocortex. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 25, 247-251.

Ferland, R.J., Cherry, T.J., Preware, P.O., Morrissey, E.E., and Walsh, C.A. (2003). Characterization of Foxp2 and Foxp1 mRNA and protein in the developing and mature brain. *The Journal of comparative neurology* 460, 266-279.

Fertuzinhos, S., Krsnik, Z., Kawasaki, Y.I., Rasin, M.R., Kwan, K.Y., Chen, J.G., Judas, M., Hayashi, M., and Sestan, N. (2009). Selective depletion of molecularly defined cortical interneurons in human holoprosencephaly with severe striatal hypoplasia. *Cerebral cortex* 19, 2196-2207.

Fietz, S.A., Kelava, I., Vogt, J., Wilsch-Brauninger, M., Stenzel, D., Fish, J.L., Corbeil, D., Riehn, A., Distler, W., Nitsch, R., *et al.* (2010). OSVZ progenitors of human and ferret

neocortex are epithelial-like and expand by integrin signaling. *Nat Neurosci* 13, 690-699.

Fode, C., Ma, Q., Casarosa, S., Ang, S.L., Anderson, D.J., and Guillemot, F. (2000). A role for neural determination genes in specifying the dorsoventral identity of telencephalic neurons. *Genes & development* 14, 67-80.

Garel, S., Marin, F., Grosschedl, R., and Charnay, P. (1999). Ebf1 controls early cell differentiation in the embryonic striatum. *Development* 126, 5285-5294.

Garel, S., Marin, F., Mattei, M.G., Vesque, C., Vincent, A., and Charnay, P. (1997). Family of Ebf/Olf-1-related genes potentially involved in neuronal differentiation and regional specification in the central nervous system. *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists* 210, 191-205.

Gerfen, C.R., Baimbridge, K.G., and Miller, J.J. (1985). The neostriatal mosaic: compartmental distribution of calcium-binding protein and parvalbumin in the basal ganglia of the rat and monkey. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 82, 8780-8784.

Godsave, S.F., and Slack, J.M. (1989). Clonal analysis of mesoderm induction in *Xenopus laevis*. *Dev Biol* 134, 486-490.

Gormley, M., and Tozeren, A. (2008). Expression profiles of switch-like genes accurately classify tissue and infectious disease phenotypes in model-based classification. *BMC bioinformatics* 9, 486.

Grunz, H., and Tacke, L. (1989). Neural differentiation of *Xenopus laevis* ectoderm takes place after disaggregation and delayed reaggregation without inducer. *Cell differentiation and development : the official journal of the International Society of Developmental Biologists* 28, 211-217.

Gu, T.L., Goetz, T.L., Graves, B.J., and Speck, N.A. (2000). Auto-inhibition and partner proteins, core-binding factor beta (CBFbeta) and Ets-1, modulate DNA binding by CBFalpha2 (AML1). *Molecular and cellular biology* 20, 91-103.

Guillemot, F., and Joyner, A.L. (1993). Dynamic expression of the murine Achaete-Scute homologue Mash-1 in the developing nervous system. *Mechanisms of development* 42, 171-185.

Guillemot, F., Lo, L.C., Johnson, J.E., Auerbach, A., Anderson, D.J., and Joyner, A.L. (1993). Mammalian achaete-scute homolog 1 is required for the early development of olfactory and autonomic neurons. *Cell* 75, 463-476.

Gunhaga, L., Jessell, T.M., and Edlund, T. (2000). Sonic hedgehog signaling at gastrula stages specifies ventral telencephalic cells in the chick embryo. *Development* 127, 3283-3293.

Hansen, D.V., Lui, J.H., Flandin, P., Yoshikawa, K., Rubenstein, J.L., Alvarez-Buylla, A., and Kriegstein, A.R. (2013). Non-epithelial stem cells and cortical interneuron production in the human ganglionic eminences. *Nat Neurosci*.

Hebert, J.M., and Fishell, G. (2008). The genetics of early telencephalon patterning: some assembly required. *Nature Reviews Neuroscience* 9, 678-685.

Hevner, R.F., Shi, L., Justice, N., Hsueh, Y., Sheng, M., Smiga, S., Bulfone, A., Goffinet, A.M., Campagnoni, A.T., and Rubenstein, J.L. (2001). *Tbr1* regulates differentiation of the preplate and layer 6. *Neuron* 29, 353-366.

Hinks, G.L., Shah, B., French, S.J., Campos, L.S., Staley, K., Hughes, J., and Sofroniew, M.V. (1997). Expression of LIM protein genes *Lmo1*, *Lmo2*, and *Lmo3* in adult mouse hippocampus and other forebrain regions: differential regulation by seizure activity. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 17, 5549-5559.

Hirsch, M.R., Tiveron, M.C., Guillemot, F., Brunet, J.F., and Goridis, C. (1998). Control of noradrenergic differentiation and *Phox2a* expression by *MASH1* in the central and peripheral nervous system. *Development* 125, 599-608.

Hisaoka, T., Nakamura, Y., Senba, E., and Morikawa, Y. (2010). The forkhead transcription factors, *Foxp1* and *Foxp2*, identify different subpopulations of projection neurons in the mouse cerebral cortex. *Neuroscience* 166, 551-563.

Houart, C., Caneparo, L., Heisenberg, C., Barth, K., Take-Uchi, M., and Wilson, S. (2002). Establishment of the telencephalon during gastrulation by local antagonism of Wnt signaling. *Neuron* 35, 255-265.

Inoue, F., Kurokawa, D., Takahashi, M., and Aizawa, S. (2012). *Gbx2* directly restricts *Otx2* expression to forebrain and midbrain, competing with class III POU factors. *Molecular and cellular biology* 32, 2618-2627.

Ip, B.K., Bayatti, N., Howard, N.J., Lindsay, S., and Clowry, G.J. (2011). The corticofugal neuron-associated genes *ROBO1*, *SRGAP1*, and *CTIP2* exhibit an anterior to posterior gradient of expression in early fetal human neocortex development. *Cerebral cortex* 21, 1395-1407.

Ip, B.K., Wappler, I., Peters, H., Lindsay, S., Clowry, G.J., and Bayatti, N. (2010). Investigating gradients of gene expression involved in early human cortical development. *Journal of anatomy* 217, 300-311.

Jain, M., Armstrong, R.J., Barker, R.A., and Rosser, A.E. (2001). Cellular and molecular aspects of striatal development. *Brain research bulletin* 55, 533-540.

Jakovcevski, I., Mayer, N., and Zecevic, N. (2011). Multiple origins of human neocortical interneurons are supported by distinct expression of transcription factors. *Cerebral cortex* 21, 1771-1782.



- Johnson, M.B., Kawasawa, Y.I., Mason, C.E., Krsnik, Z., Coppola, G., Bogdanovic, D., Geschwind, D.H., Mane, S.M., State, M.W., and Sestan, N. (2009). Functional and Evolutionary Insights into Human Brain Development through Global Transcriptome Analysis. *Neuron* 62, 494-509.
- Kang, H.J., Kawasawa, Y.I., Cheng, F., Zhu, Y., Xu, X., Li, M., Sousa, A.M., Pletikos, M., Meyer, K.A., Sedmak, G., *et al.* (2011). Spatio-temporal transcriptome of the human brain. *Nature* 478, 483-489.
- Kiyama, H., Seto-Ohshima, A., and Emson, P.C. (1990). Calbindin D28K as a marker for the degeneration of the striatonigral pathway in Huntington's disease. *Brain research* 525, 209-214.
- Kohtz, J.D., Baker, D.P., Corte, G., and Fishell, G. (1998). Regionalization within the mammalian telencephalon is mediated by changes in responsiveness to Sonic Hedgehog. *Development* 125, 5079-5089.
- Kreitzer, A.C. (2009). Physiology and pharmacology of striatal neurons. *Annu Rev Neurosci* 32, 127-147.
- Kroll, T.T., and O'Leary, D.D. (2005). Ventralized dorsal telencephalic progenitors in Pax6 mutant mice generate GABA interneurons of a lateral ganglionic eminence fate. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102, 7374-7379.
- Kunii, Y., Ikemoto, K., Wada, A., Yang, Q., Kusakabe, T., Suzuki, T., and Niwa, S. (2011). Detailed DARPP-32 expression profiles in postmortem brains from patients with schizophrenia: an immunohistochemical study. *Medical molecular morphology* 44, 190-199.
- Lagutin, O.V., Zhu, C.Q.C., Kobayashi, D., Topczewski, J., Shimamura, K., Puellas, L., Russell, H.R.C., McKinnon, P.J., Solnica-Krezel, L., and Oliver, G. (2003). Six3 repression of Wnt signaling in the anterior neuroectoderm is essential for vertebrate forebrain development. *Genes & development* 17, 368-379.
- Larsen, K.B., Lutterodt, M.C., Mollgard, K., and Moller, M. (2010). Expression of the homeobox genes OTX2 and OTX1 in the early developing human brain. *The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society* 58, 669-678.
- Lavado, A., Lagutin, O.V., and Oliver, G. (2008). Six3 inactivation causes progressive caudalization and aberrant patterning of the mammalian diencephalon. *Development* 135, 441-450.
- Lee, S.K., and Pfaff, S.L. (2001). Transcriptional networks regulating neuronal identity in the developing spinal cord. *Nat Neurosci* 4 Suppl, 1183-1191.
- Leid, M., Ishmael, J.E., Avram, D., Shepherd, D., Fraulob, V., and Dolle, P. (2004). CTIP1 and CTIP2 are differentially expressed during mouse embryogenesis. *Gene expression patterns : GEP* 4, 733-739.

Letinic, K., Zoncu, R., and Rakic, P. (2002). Origin of GABAergic neurons in the human neocortex. *Nature* 417, 645-649.

Logan, C.Y., and Nusse, R. (2004). The Wnt signaling pathway in development and disease. *Annual review of cell and developmental biology* 20, 781-810.

Long, J.E., Swan, C., Liang, W.S., Cobos, I., Potter, G.B., and Rubenstein, J.L. (2009a). *Dlx1&2* and *Mash1* transcription factors control striatal patterning and differentiation through parallel and overlapping pathways. *The Journal of comparative neurology* 512, 556-572.

Long, J.E., Swan, C., Liang, W.S., Cobos, I., Potter, G.B., and Rubenstein, J.L.R. (2009b). *Dlx1&2* and *Mash1* Transcription Factors Control Striatal Patterning and Differentiation Through Parallel and Overlapping Pathways. *Journal of Comparative Neurology* 512, 556-572.

Lupo, G., Harris, W.A., and Lewis, K.E. (2006). Mechanisms of ventral patterning in the vertebrate nervous system. *Nature reviews Neuroscience* 7, 103-114.

Ma, T., Wang, C., Wang, L., Zhou, X., Tian, M., Zhang, Q., Zhang, Y., Li, J., Liu, Z., Cai, Y., *et al.* (2013). Subcortical origins of human and monkey neocortical interneurons. *Nat Neurosci.*

Maden, M. (2002). Retinoid signalling in the development of the central nervous system. *Nature reviews Neuroscience* 3, 843-853.

Mallamaci, A., Iannone, R., Briata, P., Pintonello, L., Mercurio, S., Boncinelli, E., and Corte, G. (1998). *EMX2* protein in the developing mouse brain and olfactory area. *Mechanisms of development* 77, 165-172.

Manuel, M., Martynoga, B., Yu, T., West, J.D., Mason, J.O., and Price, D.J. (2010). The transcription factor *Foxg1* regulates the competence of telencephalic cells to adopt subpallial fates in mice. *Development* 137, 487-497.

Martin-Ibanez, R., Crespo, E., Urban, N., Sergent-Tanguy, S., Herranz, C., Jaumot, M., Valiente, M., Long, J.E., Pineda, J.R., Andreu, C., *et al.* (2010). *Ikaros-1* couples cell cycle arrest of late striatal precursors with neurogenesis of enkephalinergic neurons. *The Journal of comparative neurology* 518, 329-351.

Martynoga, B., Morrison, H., Price, D.J., and Mason, J.O. (2005). *Foxg1* is required for specification of ventral telencephalon and region-specific regulation of dorsal telencephalic precursor proliferation and apoptosis. *Dev Biol* 283, 113-127.

McKinsey, G.L., Lindtner, S., Trzcinski, B., Visel, A., Pennacchio, L.A., Huylebroeck, D., Higashi, Y., and Rubenstein, J.L. (2013). *Dlx1&2*-dependent expression of *Zfhx1b* (*Sip1*, *Zeb2*) regulates the fate switch between cortical and striatal interneurons. *Neuron* 77, 83-98.

Munoz-Sanjuan, I., and Brivanlou, A.H. (2002). Neural induction, the default model and embryonic stem cells. *Nature reviews Neuroscience* 3, 271-280.

Neve, K.A., Seamans, J.K., and Trantham-Davidson, H. (2004). Dopamine receptor signaling. *Journal of receptor and signal transduction research* 24, 165-205.

Niederreither, K., and Dolle, P. (2008). Retinoic acid in development: towards an integrated view. *Nature reviews Genetics* 9, 541-553.

Nieto, M., Schuurmans, C., Britz, O., and Guillemot, F. (2001). Neural bHLH genes control the neuronal versus glial fate decision in cortical progenitors. *Neuron* 29, 401-413.

Nobrega-Pereira, S., Gelman, D., Bartolini, G., Pla, R., Pierani, A., and Marin, O. (2010). Origin and molecular specification of globus pallidus neurons. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 30, 2824-2834.

Nordstrom, U., Jessell, T.M., and Edlund, T. (2002). Progressive induction of caudal neural character by graded Wnt signaling. *Nat Neurosci* 5, 525-532.

Oldham, M.C., Konopka, G., Iwamoto, K., Langfelder, P., Kato, T., Horvath, S., and Geschwind, D.H. (2008). Functional organization of the transcriptome in human brain. *Nat Neurosci* 11, 1271-1282.

Olsson, M., Campbell, K., Wictorin, K., and Bjorklund, A. (1995). Projection neurons in fetal striatal transplants are predominantly derived from the lateral ganglionic eminence. *Neuroscience* 69, 1169-1182.

Ouimet, C.C., Langley-Gullion, K.C., and Greengard, P. (1998). Quantitative immunocytochemistry of DARPP-32-expressing neurons in the rat caudatoputamen. *Brain research* 808, 8-12.

Ouimet, C.C., Miller, P.E., Hemmings, H.C., Jr., Walaas, S.I., and Greengard, P. (1984). DARPP-32, a dopamine- and adenosine 3':5'-monophosphate-regulated phosphoprotein enriched in dopamine-innervated brain regions. III. Immunocytochemical localization. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 4, 111-124.

Pannese, M., Polo, C., Andreazzoli, M., Vignali, R., Kablar, B., Barsacchi, G., and Boncinelli, E. (1995). The *Xenopus* homologue of *Otx2* is a maternal homeobox gene that demarcates and specifies anterior body regions. *Development* 121, 707-720.

Pei, Z., Wang, B., Chen, G., Nagao, M., Nakafuku, M., and Campbell, K. (2011). Homeobox genes *Gsx1* and *Gsx2* differentially regulate telencephalic progenitor maturation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108, 1675-1680.

Pera, E.M., Ikeda, A., Eivers, E., and De Robertis, E.M. (2003). Integration of IGF, FGF, and anti-BMP signals via Smad1 phosphorylation in neural induction. *Genes & development* 17, 3023-3028.

Piccolo, S., Sasai, Y., Lu, B., and De Robertis, E.M. (1996). Dorsoventral patterning in *Xenopus*: inhibition of ventral signals by direct binding of chordin to BMP-4. *Cell* 86, 589-598.

Quinn, J.C., Molinek, M., Martynoga, B.S., Zaki, P.A., Faedo, A., Bulfone, A., Hevner, R.F., West, J.D., and Price, D.J. (2007). Pax6 controls cerebral cortical cell number by regulating exit from the cell cycle and specifies cortical cell identity by a cell autonomous mechanism. *Dev Biol* 302, 50-65.

Rajput, P.S., Kharmate, G., Somvanshi, R.K., and Kumar, U. (2009). Colocalization of dopamine receptor subtypes with dopamine and cAMP-regulated phosphoprotein (DARPP-32) in rat brain. *Neuroscience research* 65, 53-63.

Rakic, P. (2009). Evolution of the neocortex: a perspective from developmental biology. *Nature Reviews Neuroscience* 10, 724-735.

Rakic, S., and Zecevic, N. (2003). Emerging complexity of layer I in human cerebral cortex. *Cerebral cortex* 13, 1072-1083.

Saito, T., Hanai, S., Takashima, S., Nakagawa, E., Okazaki, S., Inoue, T., Miyata, R., Hoshino, K., Akashi, T., Sasaki, M., *et al.* (2011). Neocortical layer formation of human developing brains and lissencephalies: consideration of layer-specific marker expression. *Cerebral cortex* 21, 588-596.

Schuurmans, C., and Guillemot, F. (2002). Molecular mechanisms underlying cell fate specification in the developing telencephalon. *Current opinion in neurobiology* 12, 26-34.

Sessa, A., Mao, C.A., Colasante, G., Nini, A., Klein, W.H., and Broccoli, V. (2010). Tbr2-positive intermediate (basal) neuronal progenitors safeguard cerebral cortex expansion by controlling amplification of pallial glutamatergic neurons and attraction of subpallial GABAergic interneurons. *Genes & development* 24, 1816-1826.

Sessa, A., Mao, C.A., Hadjantonakis, A.K., Klein, W.H., and Broccoli, V. (2008). Tbr2 Directs Conversion of Radial Glia into Basal Precursors and Guides Neuronal Amplification by Indirect Neurogenesis in the Developing Neocortex. *Neuron* 60, 56-69.

Shimamura, K., Hartigan, D.J., Martinez, S., Puellas, L., and Rubenstein, J.L. (1995). Longitudinal organization of the anterior neural plate and neural tube. *Development* 121, 3923-3933.

Shimamura, K., and Rubenstein, J.L. (1997). Inductive interactions direct early regionalization of the mouse forebrain. *Development* 124, 2709-2718.

Simeone, A., Acampora, D., Gulisano, M., Stornaiuolo, A., and Boncinelli, E. (1992). Nested expression domains of four homeobox genes in developing rostral brain. *Nature* 358, 687-690.

- Simeone, A., Acampora, D., Mallamaci, A., Stornaiuolo, A., D'Apice, M.R., Nigro, V., and Boncinelli, E. (1993). A vertebrate gene related to orthodenticle contains a homeodomain of the bicoid class and demarcates anterior neuroectoderm in the gastrulating mouse embryo. *The EMBO journal* *12*, 2735-2747.
- Somel, M., Guo, S., Fu, N., Yan, Z., Hu, H.Y., Xu, Y., Yuan, Y., Ning, Z., Hu, Y., Menzel, C., *et al.* (2010). MicroRNA, mRNA, and protein expression link development and aging in human and macaque brain. *Genome Res* *20*, 1207-1218.
- Stiles, J., and Jernigan, T.L. (2010). The basics of brain development. *Neuropsychology review* *20*, 327-348.
- Stoykova, A., Treichel, D., Hallonet, M., and Gruss, P. (2000). Pax6 modulates the dorsoventral patterning of the mammalian telencephalon. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* *20*, 8042-8050.
- Sussel, L., Marin, O., Kimura, S., and Rubenstein, J.L. (1999). Loss of Nkx2.1 homeobox gene function results in a ventral to dorsal molecular respecification within the basal telencephalon: evidence for a transformation of the pallidum into the striatum. *Development* *126*, 3359-3370.
- Szucsik, J.C., Witte, D.P., Li, H., Pixley, S.K., Small, K.M., and Potter, S.S. (1997). Altered forebrain and hindbrain development in mice mutant for the Gsh-2 homeobox gene. *Dev Biol* *191*, 230-242.
- Takahashi, K., Liu, F.C., Hirokawa, K., and Takahashi, H. (2003). Expression of Foxp2, a gene involved in speech and language, in the developing and adult striatum. *Journal of neuroscience research* *73*, 61-72.
- Takahashi, K., Liu, F.C., Oishi, T., Mori, T., Higo, N., Hayashi, M., Hirokawa, K., and Takahashi, H. (2008). Expression of FOXP2 in the developing monkey forebrain: comparison with the expression of the genes FOXP1, PBX3, and MEIS2. *The Journal of comparative neurology* *509*, 180-189.
- Tao, W., and Lai, E. (1992). Telencephalon-restricted expression of BF-1, a new member of the HNF-3/fork head gene family, in the developing rat brain. *Neuron* *8*, 957-966.
- Toresson, H., Mata de Urquiza, A., Fagerstrom, C., Perlmann, T., and Campbell, K. (1999). Retinoids are produced by glia in the lateral ganglionic eminence and regulate striatal neuron differentiation. *Development* *126*, 1317-1326.
- Toresson, H., Potter, S.S., and Campbell, K. (2000). Genetic control of dorsal-ventral identity in the telencephalon: opposing roles for Pax6 and Gsh2. *Development* *127*, 4361-4371.
- Vieira, C., Pombero, A., Garcia-Lopez, R., Gimeno, L., Echevarria, D., and Martinez, S. (2010). Molecular mechanisms controlling brain development: an overview of neuroepithelial secondary organizers. *The International journal of developmental biology* *54*, 7-20.



Waclaw, R.R., Allen, Z.J., Bell, S.M., Erdelyi, F., Szabo, G., Potter, S.S., and Campbell, K. (2006). The zinc finger transcription factor Sp8 regulates the generation and diversity of olfactory bulb interneurons. *Neuron* 49, 503-516.

Wang, B., Waclaw, R.R., Allen, Z.J., Guillemot, F., and Campbell, K. (2009). *Ascl1* is a required downstream effector of *Gsx* gene function in the embryonic mouse telencephalon. *Neural Dev* 4.

Wang, H.F., and Liu, F.C. (2001). Developmental restriction of the LIM homeodomain transcription factor Islet-1 expression to cholinergic neurons in the rat striatum. *Neuroscience* 103, 999-1016.

Watanabe, K., Kamiya, D., Nishiyama, A., Katayama, T., Nozaki, S., Kawasaki, H., Watanabe, Y., Mizuseki, K., and Sasai, Y. (2005). Directed differentiation of telencephalic precursors from embryonic stem cells. *Nat Neurosci* 8, 288-296.

Wichterle, H., Turnbull, D.H., Nery, S., Fishell, G., and Alvarez-Buylla, A. (2001). In utero fate mapping reveals distinct migratory pathways and fates of neurons born in the mammalian basal forebrain. *Development* 128, 3759-3771.

Xu, Q., Tam, M., and Anderson, S.A. (2008). Fate mapping *Nkx2.1*-lineage cells in the mouse telencephalon. *The Journal of comparative neurology* 506, 16-29.

Yun, K., Fischman, S., Johnson, J., Hrabe de Angelis, M., Weinmaster, G., and Rubenstein, J.L. (2002). Modulation of the notch signaling by *Mash1* and *Dlx1/2* regulates sequential specification and differentiation of progenitor cell types in the subcortical telencephalon. *Development* 129, 5029-5040.

Yun, K., Potter, S., and Rubenstein, J.L. (2001). *Gsh2* and *Pax6* play complementary roles in dorsoventral patterning of the mammalian telencephalon. *Development* 128, 193-205.

Yun, K.S., Garel, S., Fischman, S., and Rubenstein, J.L.R. (2003). Patterning of the lateral ganglionic eminence by the *Gsh1* and *Gsh2* homeobox genes regulates striatal and olfactory bulb histogenesis and the growth of axons through the basal ganglia. *Journal of Comparative Neurology* 461, 151-165.

Zecevic, N., Chen, Y., and Filipovic, R. (2005). Contributions of cortical subventricular zone to the development of the human cerebral cortex. *The Journal of comparative neurology* 491, 109-122.

Zhan, L., Kerr, J.R., Lafuente, M.J., Maclean, A., Chibalina, M.V., Liu, B., Burke, B., Bevan, S., and Nasir, J. (2011). Altered expression and coregulation of dopamine signalling genes in schizophrenia and bipolar disorder. *Neuropathology and applied neurobiology* 37, 206-219.

Zhang, B., and Horvath, S. (2005). A general framework for weighted gene co-expression network analysis. *Stat Appl Genet Mol Biol* 4, Article17.

Zhang, X., Huang, C.T., Chen, J., Pankratz, M.T., Xi, J., Li, J., Yang, Y., Lavaute, T.M., Li, X.J., Ayala, M., *et al.* (2010). Pax6 is a human neuroectoderm cell fate determinant. *Cell Stem Cell* 7, 90-100.

Zuccato, C., Valenza, M., and Cattaneo, E. (2010). Molecular mechanisms and potential therapeutical targets in Huntington's disease. *Physiol Rev* 90, 905-981.

## **PUBBLICAZIONI**

